



Aplicação de Metodologia FTIR para controlo de Qualidade em Vinhos e Aguardentes

Ana Filipa Vasconcelos Azevedo Brandão

Mestrado em Ciência e Tecnologia Alimentar

Departamento de Química

2019

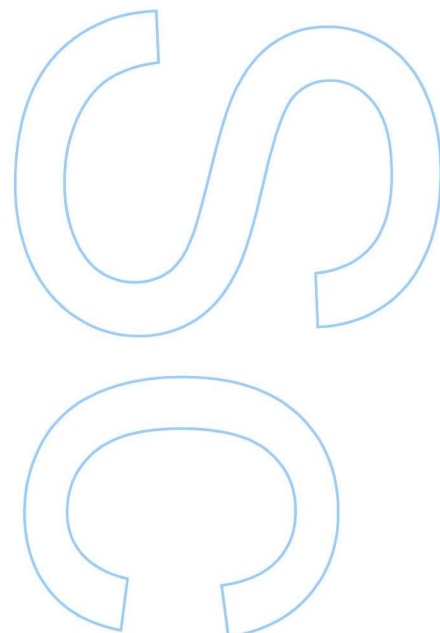
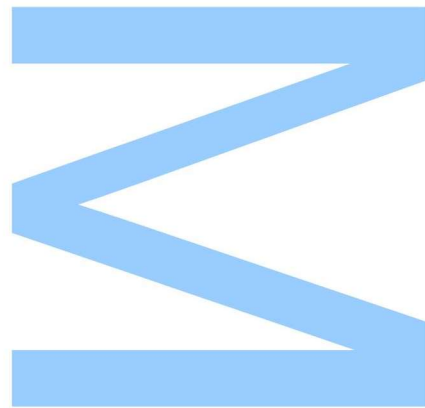
Orientador

Professor Doutor Jorge Bernardo Lacerda Queiroz, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Mestre Manuel Lima Ferreira, Chefe da Câmara de provadores, Instituto de Vinhos do Douro e Porto

Porto, 2019



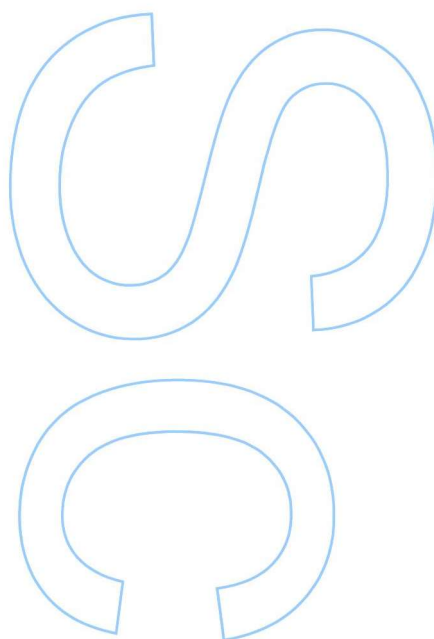
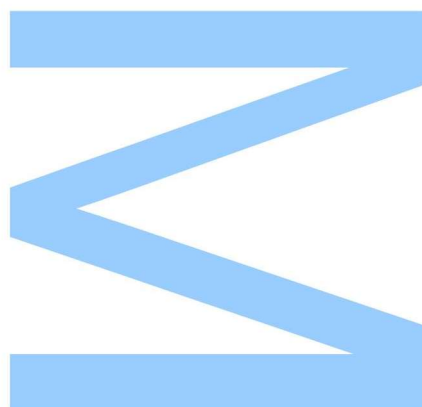


Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao Eng.º Bento Amaral, à Eng^a Natália Ribeiro e ao Eng.º Tomás Simões por me proporcionarem a oportunidade de estagiar no laboratório do Instituto dos Vinhos do Douro e Porto, I.P.

Agradeço ao Senhor Professor Doutor Jorge Bernardo Queiroz, pela disponibilidade demonstrada e pelas sugestões e orientações dadas no decorrer do trabalho.

Agradeço também ao Senhor Eng.º Manuel Lima Ferreira por todo o acompanhamento precioso durante o estágio, pela paciência e por toda a disponibilidade para ouvir e esclarecer as minhas dúvidas.

Agradeço, ainda, a todos os que trabalham no laboratório do IVDP, e que, de diversas maneiras, me ajudaram no decorrer do estágio.

Finalmente, agradeço à minha família por todo o apoio durante o meu percurso académico e aos meus amigos que me incentivam a ser sempre melhor.

Resumo

A Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma tecnologia apelativa na indústria alimentar e enológica. Esta tecnologia permite a realização de análises físico-químicas de maneira simples, rápida, não destrutiva e ecológica. Este método está a provar-se uma alternativa viável aos métodos de laboratório tradicionais que, por norma, são demorados e difíceis de executar.

Atualmente, a procura por métodos amigos do ambiente, rápidos e de fácil utilização está em pleno crescimento. Esta situação, juntamente com uma maior preocupação com o controlo de qualidade dos vinhos, faz com que a técnica de FTIR seja cada vez mais valorizada no mundo enológico. A mesma permite uma rápida análise de uma grande quantidade de amostras sem as destruir, dando resultados exatos e precisos, com base numa calibração forte e robusta. O estágio descrito em seguida, terá como base esta técnica.

Serve o presente relatório para a avaliação da Unidade Curricular “Estágio” do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar. O estágio descrito no mesmo teve a duração de 8 meses, tendo início a 3 de setembro de 2018 e terminando a 30 de abril de 2019. Este teve 2 fases principais: Numa primeira fase do trabalho, pretendeu-se incluir o estagiário no ambiente empresarial, mais especificamente num laboratório acreditado incluindo a familiarização com os requisitos da norma NP 17025.

Após o período de adaptação à rotina de trabalho do Instituto dos Vinhos Douro e Porto (IVDP), foi dado especial relevo à técnica analítica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e ao controlo e validação de resultados obtidos por dois equipamentos associados à metodologia FTIR (WineScan Flex e WineScan FT120).

Numa segunda fase, o foco do estagiário foi o melhoramento de calibrações já existentes. Foi necessário reajustar calibrações migradas do equipamento WineScan FT120 para o equipamento WineScan Flex, para que funcionassem simultaneamente em ambos os equipamentos com elevados níveis de robustez.

Esta fase do trabalho envolveu a criação de bases de dados alargadas e com diversidade de matrizes, assim como também se tornou necessária a validação das calibrações trabalhadas com amostras que não foram incluídas nestas bases de dados. Foi ainda indispensável a avaliação de parâmetros como a gama de trabalho, a precisão e a exatidão do método.

Concluindo, o presente trabalho, desenvolvido no IVDP, teve como objetivo a integração do estagiário na rotina de um laboratório acreditado, a aplicação da tecnologia FTIR para controlo de qualidade de vinhos e aguardentes e o melhoramento desta técnica.

Palavras chave: FTIR, vinho do Porto, Vinho do Douro, Acidez Total, Acidez Volátil, Massa Volúmica, Glucose, Frutose, pH, Título Alcoométrico Volúmico Adquirido, Calibrações, WineScan FT120, WineScan Flex, Interferentes.

Abstract

Fourier Transform Infrared Spectroscopy is an appealing technology in the food and wine industry. This technology allows the for physical and chemical analyses in a simple, fast, non-destructive and ecological way. This method is proving to be a viable alternative to traditional laboratory methods which are time-consuming and difficult to perform.

Nowadays, the search for environmentally friendly, fast and easy-to-use methods is booming. This situation along with a growing concern with the quality control of wines, makes the FTIR technique increasingly valued in the oenological world. It allows rapid analysis of many samples without destroying them, giving exact and accurate results, based on a strong and robust calibration. The internship described below will be based on this technique.

The present report is for the evaluation of the Curricular Unit “Internship” of the master’s degree in Technology and Food Science. The internship described lasted 8 months, starting on September 3, 2018 and ending on April 30, 2019. The work had two main phases: In a first phase the work intends to include the trainee in the business environment, more specifically in an accredited laboratory. This phase also includes familiarization of the trainee with the NP 17025 standard.

After a period of adaptation to the routine of the Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP), there is a second phase where the focus of the trainee will be the analytical technique of Fourier transform infrared spectroscopy and the control and validation of results produced by two equipment’s associated with the FTIR methodology (WineScan Flex and WineScan FT120).

In a second phase the goal of the intern was the improvement of existing calibrations. A readjustment was necessary to the migrated calibrations of the WineScan FT120 equipment so that they work simultaneously on both equipment’s.

This phase involved the creation of robust and varied sample databases, as well as the validation of the calibrations with samples that are not included in these databases. It is also essential to evaluate parameters such as the range of work, precision and accuracy of the method.

In conclusion, the present work, developed in the IVDP, had the objective of integrate the intern in an accredited laboratory, applying FTIR technology for quality control of wines and spirits and the improvement of this technique.

Key-Words: FTIR, Porto Wine, Douro Wine, Total Acidity, Volatile Acidity, Density, Glucose, Fructose, pH, Volume of Alcohol, Calibration, WineScan FT120, WineScan FLEX, Interference.

Índice

Introdução	6
1. IVDP, IP	6
2. Região Demarcada do Douro	7
2.1 História	7
2.2 Geografia	9
3. Laboratório do IVDP, IP	10
3.1 Norma NP 17025: 2005	11
4. Vinho	13
4.1 Vinho do Douro	13
4.2 Vinho do Porto	15
4.2.1 Categorias especiais:	16
5. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	18
5.1 História	18
5.2 Princípios de espectroscopia FTIR	19
5.3 Processo de absorção de radiação infravermelho ²⁴	20
5.4 Transformada de Fourier	21
5.5 Interferentes na tecnologia FTIR	22
Material e Métodos	24
1. Rotina	24
1.1 Equipamento WineScan FT120	25
1.2 Equipamento WineScan FLEX	28
1.2.1. Determinação do dióxido de enxofre no equipamento WineScan FLEX.	29
2. Migração das calibrações WineScan FT120 para WineScan FLEX	29
3. Ajuste de calibrações no equipamento WineScan FLEX	30
4. Ajuste de Calibrações no equipamento WineScan FT120	30
Resultados	33
1. Interferentes	33

1.1	Gás	33
1.2	Açúcares	34
2.	Ajuste de calibração no equipamento WineScan Flex	34
2.1	Validação da calibração	35
2.2	Estudo de robustez.....	39
2.3	Precisão do ajuste	39
2.3.1	Repetibilidade.....	40
2.3.2	Precisão intermédia.....	40
2.4	Exatidão	41
3.	Ajuste de calibração no equipamento WineScan FT120.....	41
3.1	Validação do ajuste	42
3.2	Estudo de robustez.....	44
3.3	Precisão	44
3.4	Exatidão	44
4.	Análise de Componentes Principais	45
	Conclusão	48
	Bibliografia	49

Índice de figuras

Figura 1- Logótipo IVDP.....	6
Figura 2- Limites Região Demarcada do Douro	9
Figura 3 - Esquema de um interferómetro de Michelson	20
Figura 4 - Modos de vibração molecular	21
Figura 5 - Exemplo de etiqueta de identificação de amostra	24
Figura 6 - Frasco padronizado com tampa para leitura da amostra.....	25
Figura 7 - Carta de controlo associada ao produto vinho do porto branco.....	27
Figura 8 - Gráfico relativo ao ajuste da Acidez Total em Vinhos Tranquilos	35
Figura 9 - Gráfico relativo ao ajuste do TAV no equipamento WineScan FT120	41
Figura 10 - Índices da calibração para TAV no equipamento WineScan FT120	42
Figura 11 - Calibração do PCA para vinho do Porto.....	46
Figura 12 - Validação do PCA para vinho do Porto	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Limites de aviso e de ação para amostras de Vinho Licoroso na determinação da Massa Volúmica.....	26
Tabela 2 - Comparação entre leituras da mesma amostra com e sem gás pelo método FTIR no equipamento WineScan FT120.	33
Tabela 3 - Comparação de resultados obtidos por FTIR no equipamento WineScan FT120 e pelo método oficial em vinhos com mais de 6 g/L de açúcar.	34
Tabela 4 - Valores relativos ao ajuste da Acidez Total em Vinhos Tranquilos no equipamento WineScan FLEX.	35
Tabela 5 - Teste de t de duas amostras emparelhadas para médias aos resultados obtidos para a acidez total pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WineScan FLEX (Anexo 1).	36
Tabela 6 - Teste de regressão para os resultados de acidez total obtidos para a acidez total pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WineScan FLEX.	37
Tabela 7 - Teste de t de duas amostras emparelhadas para médias para os resultados de acidez total obtidos pelo método FTIR para o equipamento WineScan FT120 e pelo mesmo método no equipamento WineScan FLEX (Anexo 2).	38
Tabela 8 - Teste de regressão aplicado aos resultados de acidez total obtidos pelo método FTIR pelo equipamento WineScan FLEX e pelo equipamento WineScan FT120 (Anexo 2).	Erro! Marcador não definido.
Tabela 9 - Resultados da repetibilidade para acidez total em vinho tranquilo no equipamento WineScan FLEX.	40
Tabela 10 - Resultados obtidos para precisão intermédia para acidez total em vinho tranquilo no equipamento WineScan FLEX.	40
Tabela 11 - Teste de t aplicado a duas variáveis emparelhadas para médias aplicado aos resultados de TAV obtidos pelo método oficial e o método FTIR no equipamento WineScan FT120. (Anexo 3)	43
Tabela 12 - Teste de regressão aplicado aos resultados obtidos pela nova calibração para TAV no equipamento WineScan FT120 e pelo método oficial. (Anexo 3).....	43

Abreviaturas

IVDP – Instituto do Vinho do Douro e Porto

IP – Instituto Público

FTIR – Fourier Transformed Infrared Spectroscopy

IV – Infravermelho

TAV – Título Alcoométrico Volúmico

AT – Acidez Total

LBV – Late Bottled Vintage

PLS – Partial Least Square

DO – Denominação de Origem

IG – Indicação Geográfica

SEC – Standard Error Calibration

EIL – Ensaio Interlaboratorial

ALABE – Associação de Laboratórios de Enologia

SE – Standard Error

PCA – Principal Component Analysis

MO – Método Oficial

RDD- Região Demarcada do Douro

Introdução

1. IVDP, IP

O Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I. P., é um instituto público, integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio, sendo um instituto público de natureza interprofissional ¹.

O IVDP, é um organismo central com jurisdição sobre todo o território nacional com sede em Peso da Régua e dispõe ainda de um serviço desconcentrado, a delegação do Porto.

O IVDP, tem por missão promover o controlo da qualidade e quantidade dos vinhos do Porto e do Douro, regulamentando o processo produtivo, bem como a proteção e defesa das denominações de origem Douro e Porto e indicação geográfica Duriense.



Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto

Figura 1 - Logótipo IVDP.

São atribuições do IVDP ²:

- a) Propor a orientação estratégica e executar a política vitivinícola para a Região Demarcada do Douro (RDD), designadamente assegurando o conhecimento de toda a fileira e da estrutura de produção e comércio, incluindo a exportação, e as ações que lhe venham a ser delegadas pelo Instituto da Vinha e do Vinho, I. P. (IVV, I. P.);
- b) Promover a convergência dos interesses da produção e do comércio na defesa do interesse geral da RDD, disciplinando, controlando e fiscalizando a produção e a comercialização dos vinhos produzidos na RDD, assegurando o ficheiro das parcelas de vinha desta região, controlando o recenseamento dos viticultores, efetuando as verificações adequadas para este efeito e determinando as correções necessárias;
- c) Controlar, promover e defender as denominações de origem e indicação geográfica da RDD, bem como os restantes vinhos e produtos vínicos produzidos, elaborados ou que transitem na RDD, sem prejuízo das atribuições do IVV.

- d) Instruir os processos de contraordenação e aplicar às infrações detetadas, pelos seus serviços ou por outras entidades, as sanções relativamente às quais disponha de competência;
- e) Estimular a adoção das melhores práticas no domínio da vitivinicultura e do desenvolvimento tecnológico;
- f) Propor e implementar a política de promoção e internacionalização dos vinhos do Douro e do Porto;
- g) Promover e implementar uma política de tratamento dos subprodutos resultantes da produção vitivinícola da RDD, salvaguardando os princípios da sustentabilidade económica e ambiental, sem prejuízo das atribuições do IVV.

O IVDP dispõe de quatro órgãos: O conselho diretivo, o conselho interprofissional, o conselho consultivo, o fiscal único.

O IVDP é dirigido pelo conselho diretivo composto por um presidente e por um vice-presidente. O conselho interprofissional é o órgão de gestão das denominações de origem e indicação geográficas da RDD, em que se encontram representados os agentes económicos envolvidos na produção e no comércio do vinho do Porto e do vinho do Douro. O conselho consultivo é o órgão de consulta, apoio e participação na definição das linhas gerais de atuação do IVDP, e nas tomadas de decisão do conselho consultivo.

2. Região Demarcada do Douro

2.1 História

A Região do Douro foi, a 10 de setembro de 1756, a primeira região vinícola demarcada e regulamentada do mundo. Uma rigorosa disciplina da produção e do comércio, do controlo e da certificação, da proteção e da defesa da denominação de origem «Porto» tem distinguido o ordenamento jurídico português. As exportações de vinho com o nome «Porto» já se efetuavam, pelo menos, desde o século XVII. Esta origem histórica e difusão internacional, acrescida da qualidade dos vinhos da Região Demarcada do Douro, atribuem à denominação de origem «Porto» um prestígio internacionalmente reconhecido. A qualidade e o prestígio da denominação de origem «Porto» exigiram uma regulamentação particularmente rigorosa. Neste sentido, foi criado, em 1926, um entreposto único e exclusivo em Vila Nova de Gaia, concentrando-se, em limites territoriais definidos, todas as empresas de vinho do Porto, de modo a garantir uma fiscalização eficiente, afiançar a pureza e a genuinidade e proteger o prestígio da denominação de origem «Porto», evitando-se as fraudes e as falsificações³. Esta disciplina jurídica tem-se mantido de forma

constante até ao presente, procedendo-se agora à sua sistematização num único decreto-lei.

Prosseguindo os objetivos de garantia de qualidade e de defesa da fama do vinho do «Porto», encontramos, já em 1934, a classificação das parcelas no interior da Região Demarcada do Douro como aptas a produzir vinho, com direito à denominação de origem «Porto». No mesmo sentido, sempre se orientou a disciplina do benefício no vinho do «Porto», estabelecida anualmente no comunicado de vindima e que funda a sua origem, pelo menos, no ano de 1936, nunca tendo sido abandonada até ao presente, e cujas regras essenciais hoje se mantêm. Trata -se de um mecanismo fundamental para assegurar a qualidade do vinho suscetível de obter a denominação de origem «Porto» ⁴. Aliás, muitos dos princípios orientadores da disciplina da produção, incluindo o benefício, estabelecidas em comunicado de vindima, permanecem desde aquela data.

A necessidade de constituição de reservas de qualidade no vinho do «Porto», de modo a assegurar o envelhecimento dos vinhos, enquanto condição indispensável para que o produto apresente as características que tanto o valorizam, exigiu do legislador o estabelecimento, antes da primeira comercialização, do regime da capacidade de vendas inicial e da capacidade de vendas adquirida, que remonta à legislação de 1907, 1908 e 1921 e, em especial, a diversos decretos-leis da década de 30 do século passado, e cujo regime atual é similar ao estabelecido em 1966 e em 1986. Estas mesmas necessidades estiveram presentes na exigência de uma existência mínima permanente já consagrada, pelo menos, em 1932.

A defesa das denominações de origem «Porto» e «Douro» e a inerente proteção dos consumidores, o prestígio internacional de tais denominações de origem, a garantia da qualidade e da genuinidade dos produtos com essas denominações de origem, a idoneidade da certificação do produto final, operação complexa que não se reduz à análise físico-química e organolética, pois inclui, igualmente, a verificação e o controlo da apresentação do produto, a sua rotulagem e as suas menções, bem como o acondicionamento, exigem que só após o engarrafamento na origem a certificação se possa considerar concluída, sendo assim efetivamente assegurada a qualidade e a genuinidade dos vinhos do «Porto» e do «Douro», bem como a grande reputação destas denominações de origem mediante este controlo das suas características particulares.

Ao lado do vinho generoso desenvolveu-se progressivamente a denominação de origem «Douro», cuja consagração legislativa surge em 1907, tendo a sua regulamentação sido completada apenas em 1982. Hoje, o prestígio granjeado pela denominação de origem

«Douro» é internacionalmente reconhecido e valorizado e a excecional qualidade do vinho é particularmente enaltecida.

2.2 Geografia

A Região Demarcada do Douro compreende uma área total de aproximadamente 45 000 hectares de vinhas, implantadas ao longo do rio Douro e seus afluentes, desde os contrafortes das serras do Marão e Montemuro, na povoação de Barqueiros a Oeste, ao km 94 a partir da foz do rio, até Barca de Alva ao km 209 na fronteira com a Espanha, a Leste (Figura 2).

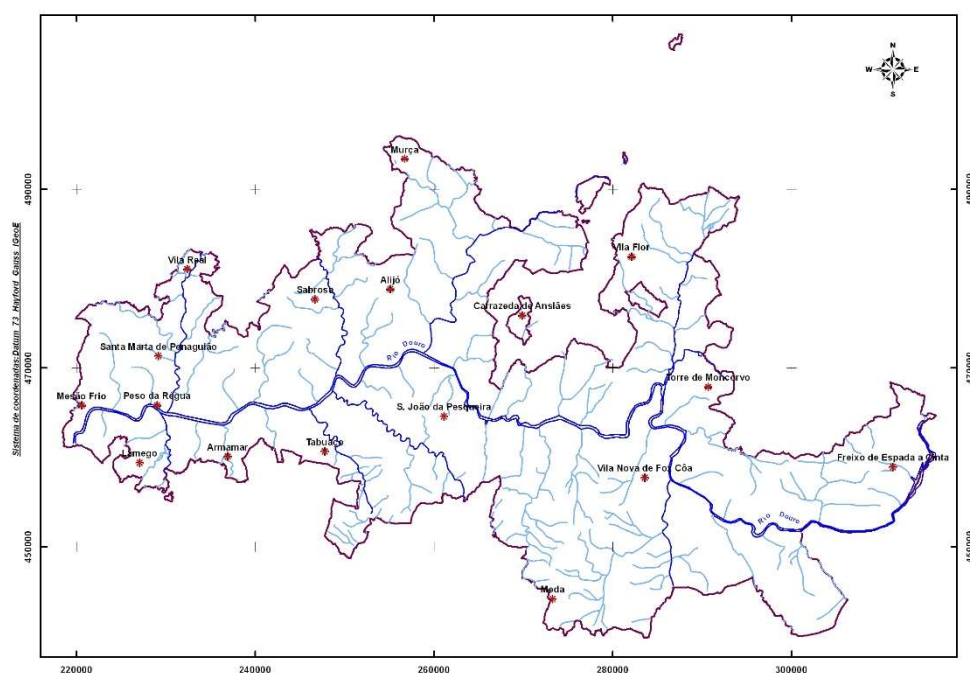


Figura 2 - Limites Região Demarcada do Douro ⁵.

A Norte e a Sul a delimitação da Região é definida por cotas dos 500 aos 600 m de altitude, já que para valores superiores de altitude o somatório de temperaturas durante a fase ativa da videira não permite obter maturações com a qualidade suficiente para a produção de vinhos com direito a Denominação de Origem. Para além do fator altitude, associado a características climáticas, regista-se ainda uma limitação a nível da origem pedológica dos solos, representada por inclusões de formação geológica granítica, com particular expressão na extensão desde Carraceda de Ansiães até ao Cachão da Valeira, já a tocar o rio Douro. Neste caso, apesar dos valores das temperaturas serem favoráveis a plena maturação das uvas, é a natureza do solo que se revela fortemente limitativa para a obtenção de vinhos do Porto de nível qualitativo desejável. De facto, uma característica muito importante da Região Demarcada do Douro assenta nos seus solos serem de origem xistosa, com elevado grau de pedregosidade, o que, associado ao clima, orografia, castas e práticas culturais, confere uma personalidade única aos vinhos nela produzidos ⁵.

Dada a elevada extensão da R.D.D., o seu relevo acidentado e irregular e as muito distintas unidades meso climáticas, foram definidas três sub-regiões principais, justificadas numa primeira análise nas respetivas características climáticas:

A sub-região do Baixo Corgo é compreendida em função das longitudes correspondentes as povoações de Barqueiros na margem norte e Barrô na margem sul, no extremo nascente da Região, e da confluência do rio Corgo com a ribeira de Temilobos, alguns quilómetros a montante. Esta sub-região, a mais antiga em termos do cultivo da vinha, é densamente povoada, e aquela onde a precipitação média anual é mais elevada associada a temperaturas relativamente mais reduzidas à das restantes duas sub-regiões, devido fundamentalmente a alguma influência atlântica presente.

A sub-região do Cima Corgo compreende o território entre o limite leste da anterior e a linha longitudinal que passa por S. João da Pesqueira, o Cachão da Valeira e Carrazeda de Ansiães. Nesta, a influência atlântica atenua-se dando lugar a um clima com características do tipo mediterrânico sendo por isso mais quente e seco no Verão do que a anterior sub-região.

Para leste, até à fronteira Espanhola, encontra-se a sub-região do Douro Superior, com particularidades climáticas ainda mais marcadamente mediterrânicas, onde as temperaturas estivais são mais elevadas e a precipitação mais reduzida, sendo frequente nalguns anos, valores anuais inferiores a 400 mm, correspondendo então a situações semiáridas durante o período estival, motivo pelo que são muito frequentes pedidos de autorização da rega da vinha junto do IVDP. Sendo o seu relevo relativamente menos acentuado em relação às outras duas sub-regiões, o que por esse facto pode permitir alguma redução dos custos de produção, porque as suas características climáticas são propícias a produção de diversos tipos de vinhos. Adicionalmente, devido à melhoria significativa das acessibilidades, e uma sub-região que, apesar de até ao momento ter uma expressão vitícola reduzida, vem sendo objeto de grandes investimentos.

3. Laboratório do IVDP, IP

Os Vinhos recebidos no IVDP são avaliados laboratorialmente. Está definido um vasto protocolo de análises físico-químicas para a aprovação de um vinho no processo de certificação (processo de registo). As determinações que se executam, sobre Vinhos do Porto empregam os métodos oficiais de análise ou, na sua falta, métodos internos validados. Dada a especificidade dos Vinhos Licorosos, diversos métodos de análise foram adaptados e validados, constituindo métodos internos.

O laboratório do IVDP encontra-se agrupado em vários sectores de análise:

- Análise físico-química
- Análise cromatográfica – fase gasosa
- Análise cromatográfica – fase líquida
- Análise mineral
- Análise microbiológica
- Análise isotópica

Neste laboratório avalia-se o cumprimento dos rigorosos requisitos qualitativos exigidos ao vinho do Porto. Dos quais, destacam-se os que se prendem com a certificação de Denominação de Origem.

O Laboratório do Instituto dos Vinhos do Douro e Porto encontra-se integrado no Sistema Português da Qualidade, desde 30 de agosto de 1994, pela Acreditação junto do IPAC ⁶ de acordo com as disposições contidas no documento NP EN ISO/IEC 17025: 2005 para diversos ensaios, quer em Vinhos licorosos / Vinhos do Porto / Vinhos, quer em Aguardentes.

O Laboratório do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto é pioneiro em Portugal na obtenção de um Certificado de Qualificação, nestes domínios, dentro do sector vitivinícola, designadamente dos vinhos licorosos e aguardentes. Encontra-se disponível para a prestação de serviços analíticos, não só ao sector do vinho do Porto como também ao sector vitivinícola nacional em geral.

3.1 Norma NP 17025: 2005

A necessidade sentida pelos estados de delegarem certas tarefas de interesse nacional noutros organismos conduziu à acreditação. Dentro destas necessidades destacam-se o controlo oficial de bens alimentares e ambientais e de produtos industriais, bem como a rastreabilidade de medições para a indústria e a promoção da competitividade. Assim, surge a primeira entidade de controlo na Austrália em 1947, com a *Nacional Association of Testing Authorities*, e ao longo das décadas de 60 e 70 vários foram os laboratórios nacionais que começaram a delegar trabalhos de calibração e rotina.

Para facilitar o controlo e a standardização destas atividades surgem as normas. Estes documentos fornecem regras, orientações ou características para produtos ou serviços tendo como objetivo atingir um grau ótimo de ordem num determinado contexto ⁷. Até à primeira edição, em 1999, da NP EN ISO/IEC 17025, foram desenvolvidos trabalhos de harmonização da regulamentação técnica e normalização. Foram publicadas normas da série EN 45000 em 1989 e, finalmente, em 2000 é publicada a NP EN ISO/IEC 17025, atribuindo-se-lhe um período de transição de dois anos, para permitir a progressiva

adaptação dos laboratórios. Esta, sim, especificamente desenvolvida para estruturar e normalizar a acreditação de laboratórios de ensaio e calibração.

A Norma ISO/IEC 17025 é uma norma internacional, publicada pela *International Organization for Standardization* (ISO), que define os requisitos gerais que são necessários para o reconhecimento de competência para levar a cabo a realização de ensaios e/ou calibrações, incluindo a amostragem, compreendendo 15 requisitos de gestão e 10 requisitos técnicos⁸. Estes requisitos delineiam a atividade de um laboratório, para que o mesmo possa vir a ser acreditado. A Norma abrange ensaios e calibrações realizados segundo métodos normalizados, não normalizados e desenvolvidos pelo próprio laboratório.

A norma utilizada pelo laboratório do IVDP trata-se da versão portuguesa da Norma Europeia EN ISO/IEC 17025:2005, resultante do trabalho desenvolvido em parceria pelo ISO/CASCO (*Committee on Conformity Assessment*) e o CEN/CLC/TC 1 (*Criteria for Conformity Assessment Bodies*), sendo a tradução da responsabilidade do Instituto Português da Qualidade (IPQ).

Esta norma aplica-se a entidades que levam a cabo ensaios e/ou calibrações, estando indicada para todos os laboratórios, independentemente do número de colaboradores, ou extensões do mesmo, no âmbito da aplicação do ensaio e/ou atividades de calibração cobertas por esta norma internacional. A Norma NP EN ISO/IEC 17025 foi publicada pela primeira vez em 2000 e veio substituir o GUIA ISO/IEC 25 e a norma EN 45001. Foi revista em maio de 2005, em virtude da revisão, em 2000, da ISO 9001.

Na realidade, embora o GUIA ISO/IEC 25 fosse muito utilizado, não contemplava todos os requisitos que estavam definidos na ISO 9001:2000, e que já se encontram contemplados, na totalidade, na Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, pelo que, os laboratórios de ensaios e calibração considerados conformes com a mesma, estarão igualmente conformes com a ISO 9001:2000.

Para conseguir a acreditação, um laboratório deve documentar um Sistema de Gestão da Qualidade⁹. A existência de um Manual de Qualidade é um requisito básico no processo de acreditação de um laboratório e os procedimentos para uma Gestão da Qualidade devem ser estabelecidos de forma a manter o bom funcionamento do sistema. Uma vez documentado, o sistema deve ser implementado no laboratório, devendo acompanhar a aplicação do processo de acreditação. O período de implementação necessita de alguns meses para reunir registos de resultados que serão revistos numa auditoria de acreditação, pela respetiva equipa de auditores.

Por fim, o laboratório passa por um processo de avaliação de conformidade com a NP EN ISO/IEC 17025, levado a cabo por uma equipa de acreditação, devidamente certificada para proceder à sua acreditação ¹⁰.

No sentido de otimizar a aplicação da norma, há que ter em conta um conjunto de definições que deve ser do conhecimento de todos os elementos da entidade em processo de acreditação, de forma a garantir que a comunicação não surge como um entrave ao processo. É da maior importância que a linguagem seja uniformizada e que todos utilizem os mesmos termos para as mesmas situações ¹¹.

A cooperação entre diferentes laboratórios ou diferentes organismos, assim como a troca de informação e experiência entre os mesmos e a harmonização de normas e procedimentos, serão largamente facilitados pelo uso da presente norma por parte de todas as entidades envolvidas.

Atualmente já existe uma nova versão da norma, NP EN ISO/IEC 17025:2018 à qual o laboratório do IVDP se está a adaptar. Esta norma permite um período de adaptação de 2 anos. Tendo isto em conta, em dezembro de 2020 o laboratório do IVDP estará completamente ajustado à mesma.

4. Vinho

O vinho tem estado connosco desde o início da civilização. É uma bebida civilizada, sagrada, romântica e que acompanha as refeições. O vinho foi elogiado durante séculos por políticos, filósofos, poetas e eruditos. Vinhos em moderação fazem parte da nossa cultura, património e estilo de vida¹².

Na União Europeia, o vinho é legalmente definido como o produto obtido exclusivamente por fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas, ou de mostos ¹³.

4.1 Vinho do Douro

Os vinhedos onde se produz o afamado vinho do Porto são os mesmos onde se produzem também vinhos com grande qualidade. Aliás, foi com base na reconhecida excelência dos Vinhos do Porto e no potencial para a produção de vinhos das castas predominantes, que a Região viu criada e regulamentada a Denominação de Origem Douro em 1982 ¹⁴, sendo que anos depois os mais exigentes especialistas e críticos começam a descobrir e a confirmar as suas características de elevada qualidade e personalidade.

Os vinhos durienses dividem-se em três categorias principais: vinhos tintos, vinhos brancos e vinhos rosados.

Vinhos Tintos ²

São vinhos produzidos a partir de castas autóctones como por exemplo a Touriga Nacional, Touriga Franca, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão. A grande maioria dos vinhos resulta de um lote de várias castas, que lhes imprimem um perfil característico do Douro.

Podem ser vinhos para consumir jovens em que a maioria apresenta uma cor rubi e aromas de frutos vermelhos como framboesas e morangos, que podem ser complementados por notas florais e de madeira. Têm corpo médio e adstringência equilibrada. Os “Vinhos do Douro” jovens serão apreciados em todo o seu esplendor se consumidos nos primeiros anos após a vindima. Entre estes vinhos encontram-se os tintos mais adequados para acompanhar pizzas, massas, bacalhau ou pratos de carne pouco elaborados. Devem ser servidos entre os 13º e os 15 °C.

Podem ainda ser tintos de guarda, ou seja, com uma boa capacidade de envelhecimento. Têm boa profundidade de cor e aromas complexos e intensos. Quando novos, é comum surgirem notas de frutos pretos, chocolate, balsâmicas, violeta e madeira, sendo vinhos de grande estrutura e com taninos persistentes. No seu apogeu, que pode levar quase uma década a atingir, apresentam aromas de grande complexidade. Na boca o vinho amacia, mas mantém-se equilibrado. Uma parte significativa dos vinhos de guarda produzidos no Douro apresenta no rótulo a designação “Reserva” ou “Grande Reserva”.

Vinhos Brancos ²

No Douro existem grandes vinhos brancos para serem descobertos. Os vinhos secos são produzidos por lotação de várias castas como por exemplo a Malvasia Fina, o Viosinho, o Gouveio e o Rabigato.

Tal como no caso dos tintos, os vinhos brancos podem ser vinhos para serem consumidos jovens. Estes têm uma cor pálida, com refrescantes aromas a citrinos e outros frutos de árvore e florais. Na boca são equilibrados mostrando a sua juventude. São um bom acompanhamento de pratos de peixe, saladas, podendo ainda ser bebidos como aperitivos. Devem ser consumidos a uma temperatura entre os 8º e os 10 °C.

Já os brancos de guarda, tal como acontece com os tintos de guarda, são vinhos que atingem o seu auge passado alguns anos. Apresentam boa intensidade aromática e boa complexidade e geralmente fermentam ou estagiam em madeira, apresentando nesses casos uma cor dourada e aromas tostados e de fruta tropical. No palato são cheios e

persistentes. Acompanham bem pratos de peixe gordo como o salmão ou o bacalhau, podendo também ser servidos com frango ou coelho acompanhados de molhos suaves. A maioria destes vinhos ostenta a designação Reserva e Grande Reserva e devem ser servidos a uma temperatura que ronde os 12 °C.

Vinhos Rosados²

Acompanhando a tendência de consumo a nível mundial, a região do Douro tem visto nascer um número cada vez maior de vinhos rosados. Estes vinhos produzidos a partir de uma maceração ligeira de uvas tintas, apresentam uma bela cor rosada e exuberantes aromas jovens de framboesa, cereja e rebuçado. Na boca, entusiasmam pela sua suavidade, doçura e acidez. São ótima companhia para um aperitivo no verão, assim como se conjugam na perfeição com a gastronomia de fusão e a oriental, como a japonesa, indiana ou tailandesa e vietnamita. Devem ser consumidos enquanto jovens (1 a 2 anos) e servidos ligeiramente frescos, entre 10° e 12° C.

4.2 Vinho do Porto

O vinho do Porto é um vinho licoroso, produzido na Região Demarcada do Douro, sob condições peculiares derivadas de fatores naturais e de fatores humanos e distingue-se dos vinhos comuns pelas suas características particulares ¹⁵ .

Os primeiros documentos referentes à produção deste vinho datam do século XII ¹⁶ mantendo-se até hoje como um dos vinhos mais apreciados no mundo. Entre eles há uma enorme diversidade de tipos. É caracterizado por ter uma riqueza e intensidade de aroma incomparáveis, uma persistência muito elevada, um teor alcoólico elevado (compreendido entre os 18 e os 22% vol, com exceção do vinho branco leve seco ⁴) ,uma vasta gama de doçuras e grande diversidade de cores. Existe um conjunto de menções tradicionais que possibilitam a identificação dos diferentes tipos de vinho do Porto.

Há uma grande diversidade de variedades de videira cultivadas nesta região. Condições como: o relevo acentuado, as altas variações de temperatura entre as estações, a baixa pluviosidade e a intensa luz solar, distintivos da região duriense levam a uvas pigmentadas, altamente aromáticas, com alta concentração de açúcar e compostos fenólicos. Estas, são selecionadas com muito cuidado, para eliminar maus cachos de uva e uvas estragadas ¹⁷ .

O vinho é tradicionalmente fermentado em lagares de granito com 80 cm de altura e 2,5 a 110 hl, onde uma fermentação parcial e lenta é procurada. As uvas são pisadas durante várias horas todos os dias até o terceiro dia de maceração. A fermentação ocorre simultaneamente. A manta formada pelo bagaço é imersa por meios mecânicos em intervalos regulares. Quando a densidade desejada é atingida, o lagar é aberto e o vinho

fluiu para dentro dos barris. É adicionada aguardente ao vinho nos barris para parar a fermentação e aumentar o teor alcoólico para 18–19% vol ¹⁵.

Os vinhos do Porto podem ser divididos em duas grandes categorias, de acordo com a maneira de envelhecer: estilo Tawny, vinho envelhecido em barril e estilo Ruby, vinho envelhecido em garrafa. No entanto, os vinhos envelhecidos em garrafa também são mantidos nos barris, mas por períodos muito mais curtos. O estilo Ruby compreende as seguintes categorias: Ruby, Reserve, Late Bottled Vintage (LBV) e Vintage. O vinho do estilo Tawny é obtido através da mistura de vários vinhos envelhecidos por diferentes períodos de tempo nos barris ou nas cubas. Para estes vinhos, a idade indicada na garrafa é uma idade média de todos os vinhos combinados. As categorias presentes neste estilo são: Tawny, Tawny Reserve, Tawny com indicação de idade (10, 20, 30 e 40 anos) e Colheita. Há ainda vinho do Porto Branco e Rosado.

4.2.1 Categorias especiais:

Entre todos os diversos tipos de vinho do Porto existem aqueles que se destacam pela sua qualidade superior. Para os distinguir foram criadas as “categorias especiais” que incluem:

Os Vintage - vinho do Porto com características organoléticas de excecional qualidade, proveniente de uma só vindima, retinto e encorpado, de aroma e paladar muito fino. Para ser reconhecido como vintage, os vinhos devem ser muito encorpados e de cores profundas. Têm um estágio entre 2 a 3 anos antes de serem engarrafados. No engarrafamento deverão ser utilizadas, de preferência, garrafas de vidro escuro e rolha de cortiça ¹⁸. O rótulo deve indicar o ano da colheita. O envelhecimento em garrafa pode levar de 10 a 50 anos ou mais antes do consumo. À medida que envelhece, mantém o rubi intenso de sua cor original, aromas exuberantes de frutas vermelhas e frutos silvestres, e um sabor de chocolate preto, que é equilibrado com taninos fortes. A origem remonta ao último terço do século XVIII, quando garrafas cilíndricas apareceram pela primeira vez ¹⁹.

Os Late Bottled Vintage (LBV) - São uma versão especial e única de um Porto estilo ruby. Envelhecido por mais tempo que um porto Vintage - entre 4 a 6 anos. O ano da colheita é sempre indicado no rótulo. A maioria dos portos LBV pode ser bebido com prazer assim que eles são comprados, mas alguns continuam a envelhecer bem em garrafa ¹⁸. O vinho tem uma cor vermelho rubi profunda, é extremamente encorpado e rico na boca.

Os Vinhos do Porto com Data de Colheita - vinho do Porto tinto ou branco com características organoléticas de elevada qualidade e proveniente de uma só vindima, com estágio em madeira durante um período mínimo de 7 anos após a vindima. Como os vintage e os LBV, os Colheita são o produto de uma única colheita, mas são envelhecidos

em madeira por um período mínimo de 7 anos ¹⁸. Durante a maturação em cascos de carvalho, os aromas jovens, frutados e frescos mudam através da oxidação dando origem a um buquê no qual dominam aromas de frutas secas, torrefação, madeira e especiarias. O vinho também tem uma sensação suave na boca. Portos Colheita podem possuir uma ampla gama de cores, dependendo da duração do envelhecimento. Normalmente, aparecem duas datas no rótulo, a data de colheita e a data de engarrafamento.

Os Vinhos do Porto com Indicação de Idade — vinho do Porto com características organoléticas de elevada qualidade, obtidos por lotes de vinhos de diversos anos que estagiaram em madeira, de forma a conseguir-se complementaridade de características organoléticas e reconhecido pelo IVDP com direito ao uso da designação nos termos dos números seguintes ¹⁸. As indicações de idade permitidas são:

- a) 10 anos de idade;
- b) 20 anos de idade;
- c) 30 anos de idade;
- d) Mais de 40 anos de idade ou 40 anos de idade quando o vinho tenha como destino os EUA.

Pode ser um vinho tinto ou branco. A idade indicada no rótulo corresponde à idade média aproximada dos vinhos utilizados na mistura. Na boca, o vinho é suave e equilibrado com um aroma persistente. A exposição gradual ao ar concentra e intensifica o carácter dos vinhos, criando sabores complexos que lembram mel e especiarias com essências de pêssegos secos, avelãs e baunilha.

Os Crusted — Retinto e encorpado, no momento do engarrafamento, de aroma e paladar finos, obtido por lotação de vinhos de diversos anos de forma a se obter complementaridade de características organoléticas, cujas características peculiares levam à formação de depósito (crosta) na parede da garrafa onde se efetua parte do estágio. Com estágio mínimo em garrafa de 3 anos antes do lançamento. Porto “Crusted” é engarrafado sem filtração e é previsto amadurecer como um Porto Vintage, desenvolvendo uma "crosta" de sedimentos na garrafa²⁰. O ano em que foi engarrafado deve ser indicado no rótulo.

Os Reserva — vinho do Porto com características organoléticas de muito boa qualidade, apresentando complexidade de aroma e sabor, obtido por lotação de vinhos de grau de estágio variável que lhe conferem características organoléticas específicas. Pode ser resultado de uvas tintas ou brancas. Se o vinho tinto ou branco estiver envelhecido em madeira por mais de 6 anos, ele pode ser utilizado a menção Tawny ou Branco.

5. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é a ciência que trata a interação entre a luz e a matéria. O espectro normalmente tem duas regiões: a região de *fingerprinting* de 600-1200 nm⁻¹ e a região dos grupos funcionais de 1200 a 3600 nm⁻¹.

Ao aplicar a transformada de Fourier à tecnologia existente permitiu criar um espectrómetro que trata um espectro inteiro no intervalo de tempo que iria demorar para um espectrómetro dispersivo tratar apenas uma linha de espectro.

Na espectroscopia por FTIR, a amostra não é submetida a uma variação de radiação eletromagnética, mas sim a um único pulso de radiação que consiste nas frequências de um intervalo particular. O sinal resultante consiste num conjunto de todas as possíveis frequências. Quando a transformada de Fourier é aplicada ao sinal, a frequência de resposta pode ser calculada.

Desta forma, um espectrómetro de FTIR consegue produzir o mesmo tipo de espectro que um espectrómetro convencional, mas num período de tempo muito mais pequeno ²¹.

5.1 História

A espectroscopia de infravermelho químico surgiu como uma ciência na década de 1880. Na década de 1890, A.A. Michelson, para aprofundar seus estudos da velocidade da luz, inventou o interferómetro ²².

No início dos anos 40, a espectroscopia de infravermelho era um campo científico recente e rudimentar. Houve uma preocupação pelo desenvolvimento do setor e, ainda durante os anos 40, com o desenvolvimento comercial do espectrofotómetro dispersivo de nulo ótico, este método conseguiu propagar a sua utilização.

Instrumentos dispersivos provaram o tremendo valor da análise infravermelha, e logo se tornou o pilar dos laboratórios de caracterização orgânica.

Em 1949, o astrofísico Peter Fellgett usou um interferómetro para medir a luz de corpos celestes e produziu o primeiro espectro infravermelho com transformada de Fourier. Durante muitos anos, apenas alguns grupos de pesquisa avançados com acesso a grandes computadores e com pessoal altamente qualificado, necessitava de até 12 horas para transformar um interferograma num espectro usando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

No final dos anos 60, quando microcomputadores capazes de calcular a transformada de Fourier se tornaram disponíveis, começaram a aparecer os primeiros espectrómetros FTIR

comerciais. O desenvolvimento do Algoritmo de Cooley-Tukey, que determina rapidamente a transformada de Fourier (FFT), também foi fundamental na comercialização de espectrômetros FTIR. No entanto, os primeiros espectrômetros eram grandes e caros, e estavam disponíveis principalmente em alguns laboratórios de pesquisa com grandes recursos.

Gradualmente, a tecnologia reduziu o custo, aumentou a disponibilidade e melhorou a capacidade dos sistemas de espectroscopia FTIR. A relação desempenho-preço fornecida por espectrômetros FTIR hoje era impensável há uma década atrás.

5.2 Princípios de espectroscopia FTIR

O sistema ótico de um espectrômetro FTIR é relativamente simples resumindo-se a: um interferómetro que precisa de dois espelhos, uma fonte luminosa na zona do infravermelho, um detetor de infravermelho e um *beamsplitter*, que basicamente divide o feixe luminoso em dois de igual intensidade ²³.

O design ótico deste aparelho produz um padrão a que se chama interferograma, que consiste num sinal complexo onde os seus padrões em forma de onda contêm todas as frequências que constituem o espectro de infravermelho. O interferograma é um gráfico de intensidade versus tempo, no entanto o que nos interessa é um gráfico de intensidade versus frequência. Para haver esta transformação é necessário aplicar uma operação matemática conhecida como Transformada de Fourier. Esta operação consegue separar as frequências de absorção individualmente produzindo um espectro virtualmente idêntico ao que é produzido pelos espectrômetros dispersivos habituais ²⁴.

O centro de qualquer espectrômetro FTIR é o interferómetro. Há 3 tipos de interferómetros: Michelson, Fabry-Perot e *lamelar grating*. Os espectrômetros que utilizam o Fabry-Perot têm um baixo poder de resolução comparados com os outros dois. O Michelson é preferencialmente escolhido para os espectrômetros comerciais em detrimento do *lamelar grating* porque é mais fácil de montar e operar ²¹. O interferómetro Michelson consiste basicamente num *beamsplitter* que deve ter pelo menos 50% de refletividade, não absorver nem gerar radiação e transmitir metade de toda a luz no intervalo de comprimento de onda utilizado ^{21,25}. O *beamsplitter* divide o feixe em dois que são refletidos por ambos os espelhos de volta para o *beamsplitter* onde eles se recombinaem e interferem. O feixe de IR recombinaado passa pela amostra e chega ao detetor (Figura 3). A posição e o movimento do espelho móvel são controlados pelo laser de hélio-neon ²⁶.

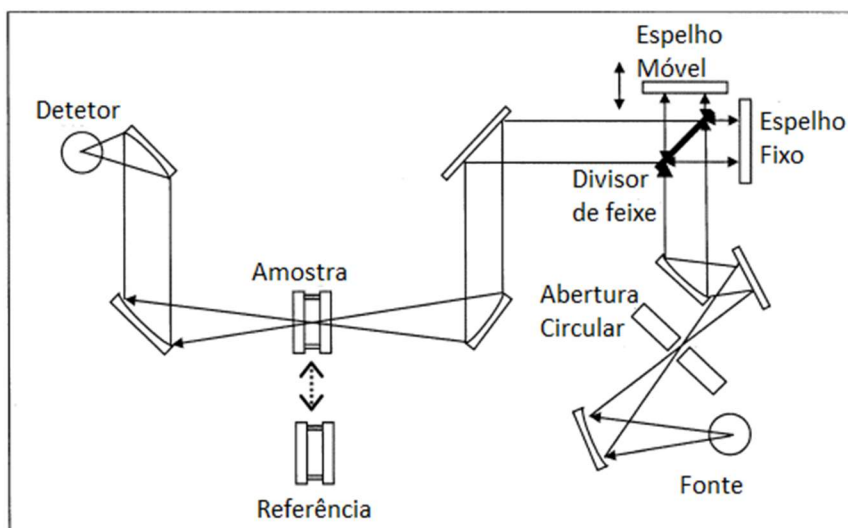


Figura 3 - Esquema de um interferômetro de Michelson²⁶.

5.3 Processo de absorção de radiação infravermelho ²⁴

A absorção da radiação IR está confinada em grande parte para espécies moleculares que têm pequenas diferenças de energia entre vários estados vibracionais e rotacionais. Ou seja, uma molécula apenas absorverá energia no IR, capaz de ser medida experimentalmente se o movimento vibracional provocar uma alteração no seu momento de dipolo.

Os dois tipos principais de vibrações moleculares são classificados em vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre os dois átomos, podendo ser de dois tipos: estiramento simétrico e estiramento assimétrico. As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança do ângulo entre duas ligações e podem ocorrer no plano ou fora do plano da molécula. São comuns quatro tipos de vibrações fundamentais descritas como tesoura (*scissoring*), rotação (*rocking*), balanço (*wagging*) e torção (*twisting*), apresentados na Figura 4.

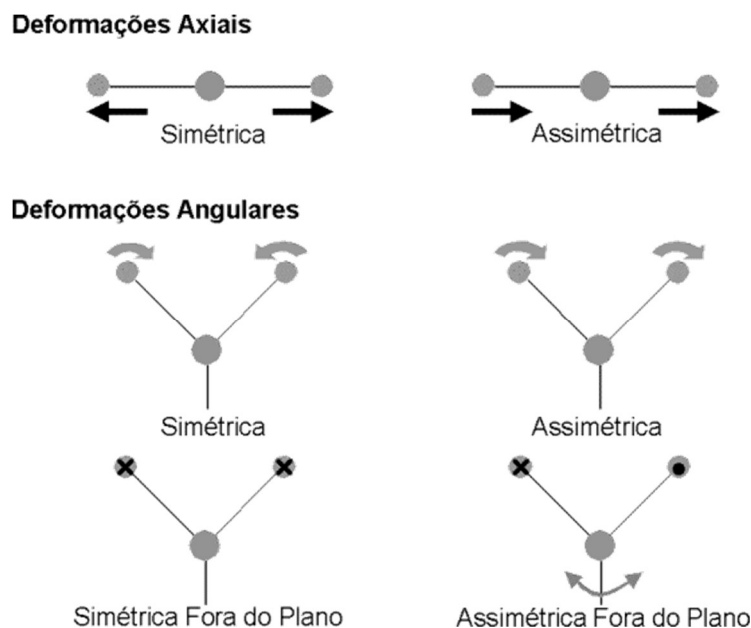


Figura 4 - Modos de vibração molecular ²⁷.

Tal como acontece com outros tipos de energia, as moléculas são excitadas para um nível mais alto de energia quando absorvem radiação infravermelha. Assim como outros processos de absorção, a absorção de infravermelho pode ser um processo quantificável. A radiação neste raio de energia corresponde ao raio que abrange as frequências vibracionais de alongamento e dobra das ligações na maioria das moléculas covalentes. No processo de absorção as frequências de infravermelho que correspondem à frequência vibracional natural das moléculas em questão são absorvidas, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações das moléculas.

É importante, no entanto, ter noção que nem todas as ligações são capazes de absorver radiação infravermelho, mesmo se a frequência da radiação corresponda exatamente à do movimento da ligação. Só aqueles que têm um momento dipolo que muda em função do tempo são capazes de absorver radiação IV. Ligações simétricas como H₂ e Cl₂ não são capazes de o fazer. Uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que é carregado à mesma frequência que a radiação que recebe para que a energia possa ser transferida. Assim, uma ligação simétrica que tem grupos idênticos ou semelhantes em cada lado não vai absorver radiação infravermelha.

5.4 Transformada de Fourier

O funcionamento da espectroscopia por FTIR pode ser resumido nos seguintes passos: é gerado um sinal, interferograma, pelo interferómetro. Este interferograma é o sinal que o detetor de infravermelhos recebe em função da diferença entre os dois raios do interferómetro. O espectro é obtido ao aplicar a transformada de Fourier ao interferograma.

O princípio por trás da transformada de Fourier é que qualquer onda (ou função periódica) pode ser expressa como uma soma de funções de seno e cosseno (Serie de Fourier).

A integral utilizada em espectroscopia de Fourier pode ser obtida pela definição do teorema da integral de Fourier e pelo princípio de sobreposição das ondas. Assim, a intensidade, que é uma função da diferença x é submetida a uma transformação como um espectro inteiro S , que depende da frequência ν . Dai surge:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x)e^{+i2\pi\nu x} dx = F^{-1}[I(x)]$$

Onde,

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu)e^{-i2\pi\nu x} d\nu = F[S(\nu)]$$

Assim, a primeira integral denomina-se transformada de Fourier inversa enquanto que a segunda integral se denomina transformada de Fourier. Deste modo a integral dada pela equação 1 converte o interferograma $I(x)$, que é uma função da diferença de “caminhos” x , no espectro $S(\nu)$, que é por sua vez função da frequência (ν) ²¹.

5.5 Interferentes na tecnologia FTIR

A lei de Beer-Lambert afirma que a concentração de um certo composto é diretamente proporcional à sua absorbância num determinado comprimento de onda²⁸. No entanto, esta relação pode ser afetada pela presença de outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda. Estes compostos são apelidados de interferentes.

Há registos de interferência devido ao etanol ²⁹, água, açúcares e ácidos orgânicos ^{30,31}. O problema é o domínio da absorção de certos componentes como o etanol, água e açúcares que influenciam a determinação de outros componentes. Para além disso, exemplos como o ácido acético e os açúcares, em vinhos secos, uma vez que estão em baixas concentrações e têm frequências de absorção muito próximas de componentes em alta concentração.

No vinho, a doçura é provocada por açúcares originários da uva, como a glucose ou a frutose, sendo a sensação realçada por álcoois resultantes da fermentação como o etanol, ou o glicerol ³². Estes dois grupos são caracterizados organicamente pela presença de grupos O-H, assim sendo, é simples perceber que a zona de absorção vai ser próxima um do outro explicando assim o porquê de haver interferência entre estes dois grupos.

A interferência causada pela absorvância da água no caso do vinho é corrigida pelo uso do líquido zero S-6060da Foss que é lido antes das amostras. Para tentar minimizar a interferência de outros compostos é importante haver medições de vários comprimentos de onda. Isto significa que é necessário ler e relacionar o comprimento de onda característico do composto que tenciono medir, com o comprimento de onda específico dos interferentes que absorvem na mesma região de IV. Para isso utiliza-se um algoritmo estatístico denominado PLS, que permite a correlação entre vários comprimentos de onda.

Material e Métodos

Todos os métodos e materiais utilizados são existentes no laboratório do IVDP, IP. Este trabalho esteve focado na técnica de espectrometria por FTIR utilizada para controlo de qualidade de vinhos do Douro e Porto e aguardentes para beneficiação e lotação.

1. Rotina

O estagiário foi inserido na rotina do laboratório. Nesta, existem 4 fases que se repetem diariamente: recolha de amostras, análise das amostras, tratamento de resultados e controlo da qualidade dos mesmos.

Todos os dias entram no sistema do IVDP novas amostras de vinhos de diferentes matrizes (vinhos , vinhos espumantes, vinhos licorosos entre outros), de aguardentes e de bebidas espirituosas para diversas análises. Após a receção e codificação das amostras há uma triagem das mesmas tendo em conta questões como: se o processo é urgente, quais os sectores envolvidos nas análises e o tempo de resposta de cada análise. Depois deste processo, as amostras são distribuídas por dia para os diferentes sectores do laboratório.

As amostras estão codificadas com um número de processo do tipo ano/número do processo/ número da garrafa (Figura 5) e ainda com um número referente à finalidade. A finalidade é o tipo de protocolo a que a amostra está associada.

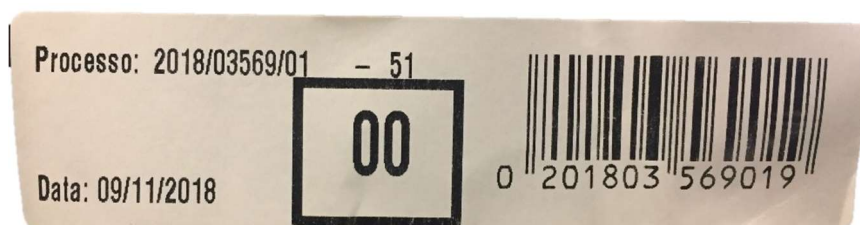


Figura 5 - Exemplo de etiqueta de identificação de amostra

Estas são recolhidas para frascos adequados (Figura 6) onde posteriormente vão ser analisadas. Habitualmente as amostras não necessitam de tratamento, no entanto, no caso de vinhos com gás ou espumantes faz-se uma desgaseificação durante 5 segundos por agitação.



Figura 6 - Frasco padronizado com tampa para leitura da amostra

Antes de proceder à leitura das amostras, o equipamento deverá ser previamente estabilizado e verificado de acordo com os procedimentos operativos estabelecidos.

Para os equipamentos FTIR, o tempo de estabilização é de 1 hora após a qual os equipamentos procedem a uma leitura do líquido zero para confirmar uma correta estabilização. Para cada amostra o equipamento produz 2 resultados e a respetiva média. Toma-se o valor da média como resultado final, desde que obedeça aos critérios do controlo de qualidade definidos.

A análise das amostras pela metodologia FTIR, é efetuada recorrendo a dois equipamentos: um Foss WineScan FT120 (WineScan FT120) e um Foss WineScan Flex (WineScan FLEX).

1.1 Equipamento WineScan FT120

Um dos equipamentos utilizados na rotina de trabalho no IVDP, é composto pelo equipamento WineScan do modelo FT120 da Foss, pelo amostrador automático 5027 Sampler Foss Tecator da Foss e pelo *software* “Foss FT120 Software” – Versão 2.2.1.

Este equipamento necessita de dois reagentes para o seu funcionamento: líquido zero S-6060 e líquido de lavagem S-470. Ambos são preparados utilizando soluções fornecidas pela Foss. O líquido zero é preparado diluindo uma medida pré-definida pela Foss em 5L de água desionizada. A água utilizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milipore Mili-Q System. Por outro lado, o líquido de lavagem para o WineScan FT120 é preparado ao diluir 25mL da solução padrão da Foss em 5L de água desionizada. Os parâmetros acreditados para este método são Acidez Volátil, Massa Volúmica, Acidez Total, pH, Título Alcoométrico Volúmico (TAV) e Glucose + Frutose (em vinhos licorosos).

No início e no final de uma sequência de trabalho, devem ser lidas 2 amostras piloto (padrões de controlo) de vinho licoroso e 1 amostra piloto de vinho, representativas das gamas de trabalho dos parâmetros analíticos em avaliação. A diferença entre o resultado do piloto no WineScan FT120 e no método oficial, deverá ser inferior ou igual aos limites

de aviso estabelecidos para cada um dos parâmetros analíticos (exemplo na Tabela 1). Se tal acontecer, fica validada a sequência de trabalho, para cada um desses parâmetros.

Tabela 1 - Limites de aviso e de ação para amostras de Vinho Licoroso na determinação da Massa Volúmica

Limites de Aviso e de Acção para Amostras Pilotos em Vinhos Licorosos		
Análise	<i>Limites de Aviso</i>	<i>Limites de Acção</i> (Tolerância máxima permitida entre métodos)
Massa Volúmica (g/cm³)	$v_{ref}^a \pm 0,0003$	$v_{ref}^a \pm 0,0004$

As Amostras Piloto correspondem a Padrões de Controlo Interno e são utilizadas para verificar se as calibrações em utilização no equipamento WineScan FT 120 se mantêm estáveis ao longo do tempo. Cada amostra piloto é analisada num determinado “Produto”. Um “Produto” corresponde a um conjunto de calibrações específicas para determinada matriz. As amostras piloto de Vinho Licoroso e de Vinho são controladas em “Produtos” que são cópias dos “Produtos” originais onde são efetuadas as leituras para as respetivas matrizes ³³.

A cada “Produto” utilizado para a leitura das amostras piloto, estão associadas cartas de controlo (exemplo na Figura 7). Os valores de referência das cartas de controlo são obtidos por métodos alternativos validados. Deste modo, estas cartas servem para verificar o desempenho do processo, isto é, se está ou não fora de controlo, permitindo detetar possíveis não conformidades. É por isso que o objetivo destas consiste em manter a qualidade satisfatória e uniforme do produto em estudo, acabando a média e o desvio-padrão por serem constantes, se existir controlo. Estas cartas permitem a intervenção imediata, em casos de anomalias, acabando por reduzir os riscos de rejeição de produtos e erros nos resultados. A estes valores estão associadas tolerâncias que estabelecem os Limites de Aviso e de Ação ³⁴.

As amostras piloto são obtidas de duas maneiras diferentes tendo em conta se são vinhos tranquilos ou licorosos. Para os vinhos tranquilos utilizam-se vinhos comerciais *bag-in-box* em que os parâmetros acreditados se encontram dentro das gamas de trabalho. Para o caso dos vinhos licorosos são feitos lotes internos com parâmetros dentro da gama de trabalho.

Para as amostras diárias é necessário escolher o “Produto” correto tendo em conta o tipo de matriz. Assim, faz-se uma distinção entre 3 tipos de matrizes principais: vinho tranquilo, vinho licoroso e aguardente. Isto acontece, pois, é necessário calibrar cada produto especificamente com matrizes semelhantes à que se pretende ler.

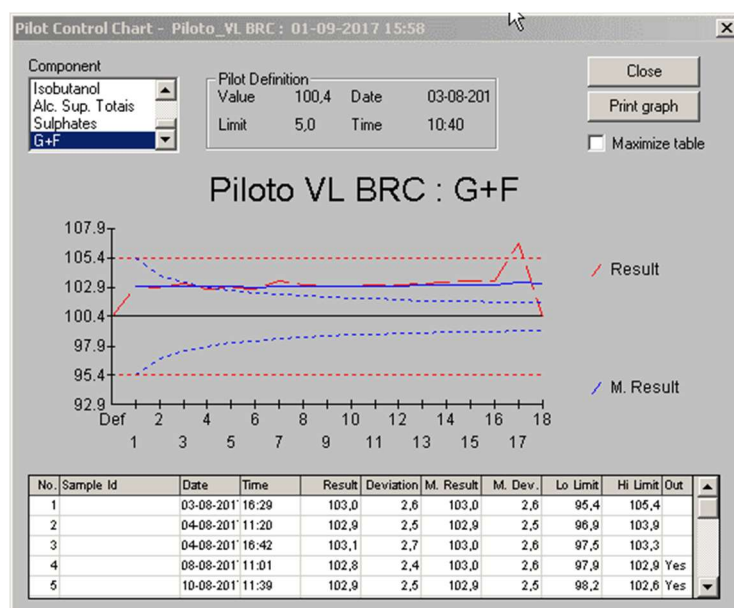


Figura 7 - Carta de controlo associada ao produto vinho do Porto branco

1.1.1. Manutenção interna

Para garantir que o equipamento tem todas as condições para funcionar corretamente é necessário ter implementado procedimentos de manutenção interna.

O primeiro protocolo implementado é o da equalização devendo esta operação ser realizada mensalmente. Esta operação realiza-se para corrigir eventuais oscilações instrumentais que ocorrem ao longo do tempo. Esta operação utiliza o líquido zero e o líquido FTIR Equalizer, ambos previamente preparados e comercializados pela empresa FOSS. O líquido FTIR Equalizer deve ser conservado a temperaturas inferiores a 5° C e retirado da câmara refrigeradora apenas quando se inicia o processo de equalização. Antes de iniciar a operação deve fazer-se uma limpeza. Depois de iniciada a operação o equipamento faz 5 leituras do líquido zero e 8 leituras do líquido FTIR Equalizer. Quando a equalização é bem-sucedida, deve-se reiniciar a aplicação efetuar uma lavagem, uma leitura do líquido zero e, para verificar se a equalização alterou alguma calibração é necessário ler todos os pilotos e duas amostras do dia.

Há também a necessidade de verificar se há *carry-over* de uma amostra para a seguinte. Para isso realiza-se, uma vez por mês, a operação de purga. Esta operação consiste na leitura de líquido zero seguida pela leitura de um vinho licoroso ou vinho. Este ciclo é repetido 6 vezes sendo depois calculados os coeficientes de contaminação para cada parâmetro. Quando estes estão próximos de 100% aceita-se a purga.

Quanto ao *software* há duas operações necessárias. A primeira é a manutenção da base de dados. Isto tem como objetivo principal efetuar uma verificação e reparação de eventuais inconsistências que sejam detetadas na base de dados do equipamento

WineScan FT120. Com esta operação é efetuada igualmente uma limpeza de dados obsoletos e um *backup* da base de dados, para não perder informação e garantir a rastreabilidade de resultados. Isto faz também com que o sistema fique mais rápido e evita erros informáticos no programa. Finalmente, há ainda a operação de verificação do Laser (Test Mirror/Grain Adjustment) que deve ser efetuado com periodicidade mensal. O valor do Laser deve ser superior a 55. Se tal não acontecer, o laser necessita de afinação ou encontra-se em fim de vida.

Concluindo, há uma constante preocupação em garantir o rigor e a autenticidade dos resultados, assim como o bom manuseamento e manutenção dos equipamentos, daí a necessidade de manter um sistema rigoroso de acompanhamento dos equipamentos.

1.2 Equipamento WineScan FLEX

Outro dos equipamentos utilizados é composto pelo equipamento WineScan do modelo Flex da Foss, pelo amostrador ASX-260 Autosampler da Cetac e pelo software “Foss Integrator - versão 1.6.1”. Trata-se de um analisador automático FTIR equipado com interferómetro de fibra ótica com proteção para variações de humidade e temperatura. O equipamento está preparado para analisar uma mesma amostra simultaneamente em fase líquida e em fase gasosa, o que não acontece no equipamento WineScan FT120 que apenas opera em fase líquida.

Este equipamento utiliza 4 reagentes: líquido de lavagem, líquido zero, ácido ortofosfórico 25%vol e líquido de equalização. O líquido de lavagem para o WineScan FLEX prepara-se diluindo 100mL da solução padrão em 2L de água desionizada. No caso do equipamento WineScan FLEX este necessita ainda de uma solução de ácido ortofosfórico a 25%. Esta solução, por sua vez, é preparada ao adicionar 586 mg de ácido ortofosfórico a 2L de água desionizada no final adiciona-se 1,5mL de líquido anti espuma. Há ainda uma quarta solução, o líquido para controlo da equalização, que não sofre uma preparação por parte do laboratório uma vez que já vem pré-preparada pelo fornecedor, Foss. As soluções mãe de lavagem e a solução de equalização, tal como no caso do WineScan FT120, armazenam-se numa arca refrigeradora a uma temperatura compreendida entre 2-8 °C.

O equipamento WineScan Flex está preparado para analisar uma mesma amostra simultaneamente em fase líquida e em fase gasosa. O equipamento possui um interferómetro adaptado para permitir determinação analítica em fase gasosa e fase líquida, com uma combinação de cuvete dupla. Desta forma e em condições otimizadas, a análise em fase gasosa permite uma aproximação da metodologia de medição do SO₂ livre e do SO₂ total à do método de referência (Método OIV-MA-AS323-04A).

O dióxido de enxofre tem características muito específicas no espectro do infravermelho médio. Após obtenção do espectro pelo equipamento, este é submetido a técnicas de modelagem matemática (transformada de Fourier) sendo, desta forma, o sinal de dióxido de enxofre separado e quantificado com precisão. Esta técnica é baseada na absorção da radiação infravermelha pelo material analisado (espectro obtido em fase gasosa).

1.2.1. Determinação do dióxido de enxofre no equipamento WineScan FLEX.

O método para quantificar o SO₂ utilizado pelo equipamento WineScan Flex reproduz, numa escala mais pequena, o método OIV-MA-AS323-04A. O procedimento no método OIV é o seguinte:

A amostra e o ácido fosfórico são introduzidos numa câmara de reação, formando uma mistura. Esta câmara de reação é aquecida a 85 °C. Através da circulação contínua de ar, o gás é encaminhado para a cubete de gás onde se produz o espectro de infravermelho. O SO₂ livre é libertado quase que instantaneamente do líquido para um equilíbrio com o volume de gás. O dióxido de enxofre combinado é hidrolisado pelo ácido ortofosfórico a 25% e libertado mais lentamente em volume de gás com a corrente de gás de recirculação. O dióxido de enxofre total é hidrolisado pelo ácido e libertado mais lentamente em volume de gás com a corrente de gás de recirculação.

A análise de gás por FTIR permite integrar a solução no WineScan Flex sem o uso de outras tecnologias de deteção. O interferómetro existente é adequado para análise em fase gasosa e líquida, em combinação com uma solução de cubete dupla. Esta integração torna o método WineScan SO₂ próximo do método de aeração / oxidação. Além disso, emprega a mesma química para a reação da amostra. Requer 2 ml de amostra (vinho) e 1 ml de ácido fosfórico a 25%.

Para a obtenção de um valor analítico, é necessário efetuar ajustes em calibrações existentes, disponibilizadas pelo fabricante. Os ajustes são efetuados a partir dos resultados analíticos obtidos pelo método oficial (método de Paul). A leitura de SO₂ em vinhos pode ser considerada como uma automatização do método oficial onde a captura do dióxido de enxofre na solução de H₂O₂ é substituída pela deteção contínua de SO₂ por infravermelho.

2. Migração das calibrações WineScan FT120 para WineScan FLEX

. Durante o estágio, foi necessário efetuar ajustes em calibrações do equipamento WineScan FT120 migradas anteriormente para o equipamento WineScan FLEX. Isto acontece apenas porque o *software* utilizado no equipamento WineScan FLEX não permite a criação de novas calibrações originais, permitindo apenas os ajustes de calibrações já existentes.

Resumidamente faz-se a migração da calibração da seguinte forma: no *software* do equipamento WineScan FT120 exporta-se o produto com a calibração ou calibrações desejadas. Isto vai criar um ficheiro que é necessário converter para que consiga ser lido pelo *software* do equipamento WineScan FLEX. Para converter o ficheiro utiliza-se a aplicação FOSS Integrator Conversion Manager. Depois abre-se o *software* do equipamento WineScan FLEX, Foss Integrator e importa-se a calibração convertida.

Após ter a calibração no *software* desejado é necessário ajustar às condições do equipamento WineScan FLEX.

3. Ajuste de calibrações no equipamento WineScan FLEX

O primeiro passo para ajustar uma calibração é criar um conjunto de amostras com resultados obtidos quer pelo equipamento para o qual queremos ajustar como pelo método oficial. Este conjunto tem de ser muito robusto em termos de amostras, representando todo o tipo de vinho que possa vir a ser analisado e, se possível, equitativamente. O conjunto tem ainda que representar toda a gama de trabalho.

O programa cria uma reta de calibração mantendo os valores lidos pelo equipamento no eixo das abcissas e os valores obtidos pelo método oficial no eixo das ordenadas. Conforme a reta apresentada o programa permite eliminar os *outliers*, que aparecem sinalizados a vermelho. Os *outliers* são os valores cuja leitura no WineScan não corresponde à leitura pelo método oficial. Isto poderá acontecer devido, por exemplo, a erros aleatórios, como troca de amostra.

Após uma “limpeza” do conjunto, o *software* permite escolher entre ajustar com base no declive e/ou na interseção. No *software* Foss Integrator do WineScan FLEX normalmente utiliza-se ajuste por intercepção usando o *slope* = 1. O ajuste da calibração baseia-se numa regressão linear simples, que pode ser expressa da seguinte forma: $Y = aX + b$. Onde a é o declive, Y é o resultado final do instrumento calibrado e X é o resultado preliminar do instrumento (antes da calibração) e b é a intercepção, onde um valor próximo de 0 é o normal em ajustes para vinho. Para avaliar a qualidade do ajuste temos ainda o valor de R^2 , o coeficiente de correlação. Este valor deve estar o mais próximo possível de 1. Finalmente, quando o ajuste for aceitável é necessário guardá-lo e testar os vários padrões disponíveis nesse produto, para confirmar que o ajuste é admissível.

4. Ajuste de Calibrações no equipamento WineScan FT120

No dia-a-dia do IVDP há uma constante preocupação pela qualidade dos resultados obtidos. Para confirmar que as calibrações estão a funcionar corretamente existe um ficheiro que compara diariamente os resultados obtidos pelo equipamento FT120 e pelos

vários métodos oficiais. Deste modo, quando alguma das calibrações sofre um desvio sistemático, ao longo do tempo é necessário reajustar a mesma.

O ajuste de calibrações no equipamento WineScan FT120 tal como no equipamento WineScan FLEX tem como base um conjunto com as características descritas anteriormente – robusto, que cobre a gama de trabalho, amostras representativas. No entanto, neste programa, se o conjunto for demasiado pequeno ou se as amostras não cobrirem uma gama de trabalho razoável, aparece uma mensagem de aviso “*The set range is very limited*”.

Após a criação do conjunto, completa-se o mesmo com os valores dos métodos de referência para que o programa consiga calcular uma regressão entre valores medidos pelo equipamento e valores de referência. Para além disso, é necessário ainda eliminar os *outliers*. Neste contexto um *outlier* é um valor extremo que corresponde a uma amostra cujos resultados não correspondem ao esperado. Isto pode acontecer devido a um erro, tanto na leitura no WineScan FT120, como no método oficial. Neste caso, adicionar essa amostra ao conjunto, poderá fazer com que a calibração perca a sensibilidade. Também podem acontecer *outliers* quando a amostra tem uma matriz mais complexa muitas vezes devido a tratamentos especiais do mosto ou do vinho, e nesse caso será benéfico ser adicionado ao conjunto. Devido a estas duas possibilidades é importante haver um olhar crítico sobre os resultados para obter o conjunto mais sólido possível. Para facilitar a identificação dos *outliers* estes aparecem em conjunto com o símbolo “(?)”. Podem ser anuladas eventuais amostras com valores extremos fazendo duplo clique na lista de valores residuais. Para as introduzir novamente, fazer duplo clique sobre as amostras que aparecem a cinzento na mesma lista.

As calibrações no equipamento WineScan FT120 são obtidas pela metodologia de regressão por PLS (*partial least square*). Estudos recentes têm demonstrado que este método é uma boa alternativa aos métodos mais clássicos de regressão linear múltipla e regressão de componentes principais, porque é o mais robusto ^{35,36}. Robusto no sentido em que os parâmetros do modelo não mudam ao adicionar novas amostras à população total da calibração.

Quando se faz um ajuste no *software* do WineScan FT120 há vários indicadores de qualidade do ajuste. É necessário ter em atenção o número de observações (*observations*) efetuadas pois quanto maior esse valor maior o número de amostras utilizadas para a calibração. Neste equipamento o ajuste é efetuado tanto no declive (*slope*) como na intercepção (*intercept*). Enquanto que para o *slope* procuramos um valor próximo de 1 no

intercept queremos um valor próximo de 0 para que a ordenada na origem da reta esteja próxima do ponto (0,0).

Para avaliar o ajuste proposto dispomos de dois critérios, o SEC (*standard error of calibration*) e o R^2 . O SEC indica a precisão com que o valor real pode ser previsto para as amostras de calibração utilizadas no ajuste próximos do valor real. O R^2 é o coeficiente de correlação da reta e quanto mais próximo de 1 maior a veracidade dos valores lidos no equipamento. Para conseguir comparar o ajuste proposto ao ajuste atual são-nos dados dois critérios em relação ao ajuste que está em utilização: o SE (*standard error*) e o desvio médio (mean bias). O SE é o erro padrão para o ajuste da calibração, indica a precisão com que o valor de referência pode ser previsto para as amostras da calibração utilizando o ajuste em vigor. Se o SEC for menor que o SE podemos aceitar o ajuste. O desvio médio ajuda-nos a perceber se o ajuste realmente é necessário. Quando este desvio é maior que a repetibilidade do método de referência confirma a necessidade de reajuste.

Resultados

Para além dos resultados de rotina produzidos diariamente pela estagiária, houve ainda a oportunidade de desenvolver alguns estudos. Assim, de seguida apresentam-se exemplos de alguns dos trabalhos desenvolvidos: um estudo de interferentes, o ajuste à calibração da acidez total para o equipamento WineScan FLEX, o ajuste da calibração do Título Alcoométrico Volúmico (TAV) para o equipamento WineScan FT120 e um estudo de análise de componentes principais para Vinhos do Porto.

1. Interferentes

1.1 Gás

Como referido anteriormente - no 5.5 da introdução - o gás é um interferente significativo na leitura de amostras recorrendo à tecnologia FTIR.

Na elaboração deste estudo utilizaram-se vinhos brancos. As amostras identificadas “c/gás” foram recolhidas diretamente da garrafa, sem qualquer desgaseificação, enquanto as identificadas “s/gás”, foram colocadas no frasco de leitura e sofreram um processo de desgaseificação durante 5 segundos. Diferentes letras indicam diferentes amostras.

A Tabela 2 resume os resultados obtidos pelo equipamento WineScan FT120.

Tabela 2 - Comparação entre leituras da mesma amostra com e sem gás pelo método FTIR no equipamento WineScan FT120.

Amostra		Massa Volúmica (g/cm ³)	TAV (% v/v)	pH	Acidez Volátil (g/dm ³)	Acidez Total (g/dm ³)
A	c/gás	0,9865	12,80	3,19	-0,25	4,48
	s/gás	0,9881	13,12	3,25	0,31	5,10
B	c/gás	0,9919	11,85	2,73	0,07	8,27
	s/gás	0,9924	11,98	2,76	0,29	8,50
C	c/gás	0,9922	10,70	3,14	0,09	5,73
	s/gás	0,9928	10,79	3,16	0,32	5,98
Média das diferenças absolutas		0,0009	0,18	0,04	0,34	0,37

Os resultados obtidos confirmam o que é afirmado pela bibliografia. Existe uma notória diferença entre o valor lido em amostras com e sem gás nos parâmetros da Acidez Volátil, Acidez Total, TAV e Massa Volúmica. Com base nestes resultados podemos ainda concluir que a calibração do pH é a mais consistente e robusta, visto que não é afetada na presença de um interferente forte como o gás. Concluimos assim que amostras com gás afetam a exatidão do método e daí a necessidade da sua eliminação das amostras.

1.2 Açúcares

Na elaboração deste estudo utilizaram-se vinhos tintos. Na tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos pelo equipamento WineScan FT120. O método WineScan refere-se a resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier pelo equipamento WineScan FT120 enquanto as linhas identificadas com “Oficial” referem-se a resultados obtidos pelos métodos oficiais para cada análise. Foi considerado, com base em estudos anteriores conduzidos pelo IVDP, que o açúcar é um interferente forte a partir de 6g/L ³⁷.

Neste equipamento o resultado para açúcares redutores do vinho D foi 7,0 g/dm³ enquanto para o vinho E foi de 6,3 g/dm³.

Tabela 3 - Comparação de resultados obtidos por FTIR no equipamento WineScan FT120 e pelo método oficial em vinhos com mais de 6 g/L de açúcar.

Amostra	Método	pH	Acidez Volátil (g/dm ³)	Acidez Total (g/dm ³)
D	WineScan	3,60	0,49	4,83
	Oficial	3,64	0,37	4,78
E	WineScan	3,68	0,20	4,79
	Oficial	3,80	0,47	4,50
Média de diferenças absoluta		0,08	0,20	0,17

Tal como acontece no caso anterior, o pH é a calibração mais estável não sendo afetada pela concentração elevada de açúcares. Já no caso da acidez volátil e da acidez total o efeito é notório. A presença elevada de açúcares em amostras de vinho tranquilo afeta a exatidão do método.

2. Ajuste de calibração no equipamento WineScan Flex

Para o ajuste da Acidez Total em vinhos no equipamento WineScan Flex, utilizaram-se 24 vinhos DO Douro, entre eles encontravam-se 12 vinhos tintos, 10 vinhos brancos e 2 rosados. Neste conjunto, a amostra com AT mais baixa era de 4,10 g/dm³ enquanto que a amostra com AT mais elevada continha 7,13 g/dm³, sendo que a média do grupo era de 5,73g/dm³. Desta forma garantiu-se que a gama de trabalho, que se encontra entre 4,20 g/dm³ e 6,20 g/dm³, era respeitada.

Na Tabela 4 , apresentam-se os valores relativos ao ajuste da Acidez Total em Vinhos Tranquilos, verificando-se que o ajuste se efetuou apenas tendo em consideração a interceção.

Tabela 4 - Valores relativos ao ajuste da Acidez Total em Vinhos Tranquilos no equipamento WineScan FLEX.

	Proposto	Atual
Declive	1,00	1,00
Interceção	0,2377%	0,04533%
Precisão (abs)	0,0855%	0,2090%
Precisão (rel)	1,493%	3,650%
Correlação (R²)	0,9908	

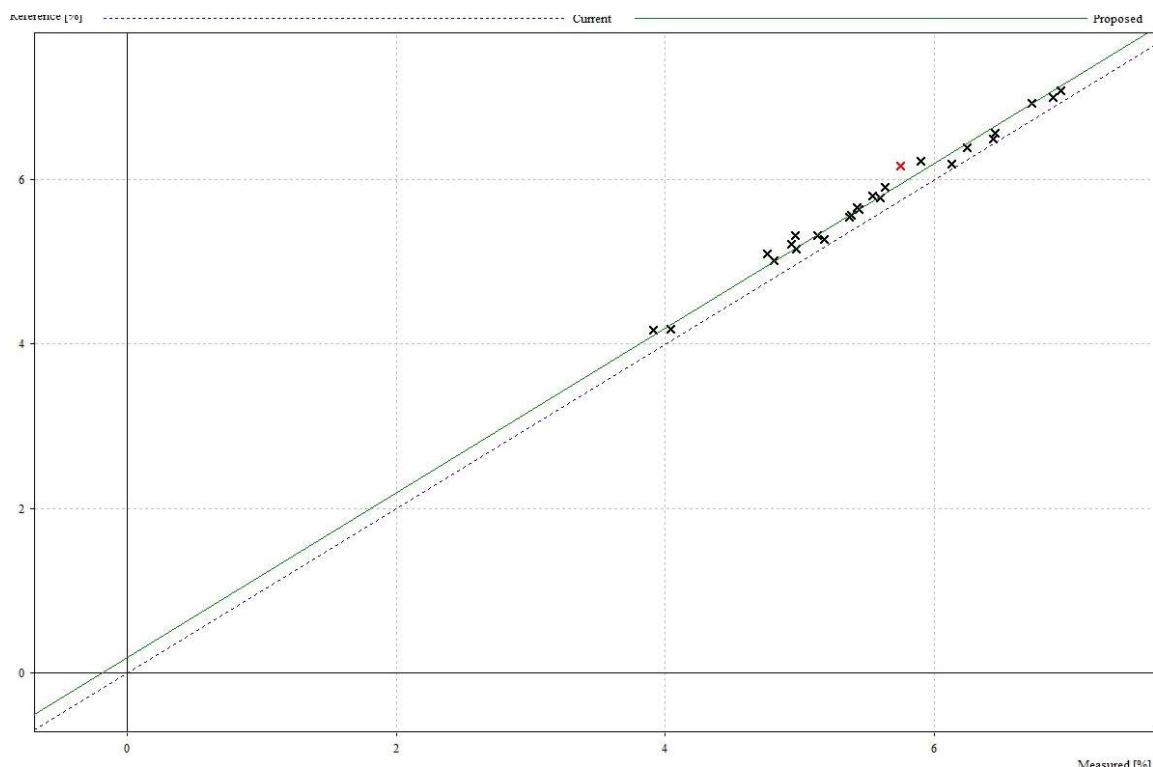


Figura 8 - Gráfico relativo ao ajuste da Acidez Total em Vinhos Tranquilos onde os outliers estão sinalizados a vermelho.

Apesar do valor da interceção se afastar mais da origem do gráfico conseguimos ver pelo gráfico da Figura 8 que isto faz com que a reta de calibração passe mais próximo dos pontos. Este ajuste tem um R^2 de 0,9904 que é um valor próximo de 1. No entanto, mesmo tendo em conta os bons indicadores do ajuste, é necessário validá-lo antes da sua utilização.

2.1 Validação da calibração

Para assegurar que o novo ajuste pode ser utilizado para produzir resultados rigorosos, é necessário efetuar uma validação com vinhos que não tenham sido utilizados no conjunto do ajuste. Para a validação deste ajuste utilizaram-se 7 vinhos brancos, 15 vinhos tintos e um rosado. Os resultados obtidos por método FTIR associados ao equipamento WineScan

FLEX foram comparados com os obtidos pelo método oficial¹. Testou-se ainda a comparabilidade entre equipamentos que seguem o método FTIR, nomeadamente o equipamento WineScan Flex e o equipamento WineScan FT120.

Aplicou-se um teste de t estatístico de duas amostras emparelhadas para médias. Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos sobre amostras iguais, na mesma gama de concentração. Assenta no pressuposto que quaisquer erros aleatórios e/ou sistemáticos são independentes da concentração.

Este teste exige que o número de ensaios seja igual para ambos os métodos, pois o estudo é feito em torno das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos para cada amostra analisada. Este teste pressupõe também a comparação entre dois valores de t, o t experimental designado por t_{exp} , e o t tabelado designado por t_{tab} , sendo tomado como critério de aceitação de H_0 : $t_{exp} \leq t_{tab}$ isto é, conclui-se que os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Tabela 5 - Teste de t de duas amostras emparelhadas para médias aos resultados obtidos para a acidez total pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WineScan FLEX (Anexo 1).

	<i>Valor M.O.</i>	<i>Valor WineScan</i>
Média	5,159565217	5,116086957
Variância	0,34432253	0,339252174
Observações	23	23
Correlação de Pearson	0,992199345	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	22	
Stat t	2,850487151	
P(T<=t) uni-caudal	0,004651124	
t crítico uni-caudal	1,717144374	
P(T<=t) bi-caudal	0,009302249	
t crítico bi-caudal	2,073873068	

O teste de t foi realizado, com um intervalo de confiança de 95%. Neste teste foi considerada que H_0 = os métodos são estatisticamente semelhantes.

Verifica-se pela análise da Tabela 5, que se rejeita H_0 e que os métodos não são estatisticamente comparáveis para a determinação da acidez total em Vinhos. Na sequência desta análise, foi calculado o intervalo de confiança (Tabela 6), onde, com 95% de probabilidade, se situa a diferença de resultados obtidos pelos dois métodos. Para este efeito, o primeiro passo foi criar a população diferença (Anexo 1) tendo-se calculado a

¹ OIV-MA-AS-313-01

média e o desvio padrão desta nova população. Desta forma, calculou-se de seguida o intervalo de confiança a 95 % probabilidade.

Tabela 6 - Cálculo do Intervalo de confiança para as diferenças entre método oficial e WineScan Flex (Anexo 1).

Média da diferença absoluta	0,0435
Desvio padrão	0,073150449
t tabelado	1,959963985
Limite sup. intervalo	0,06
Limite inf. intervalo	0,03

Com base na observação dos dados da Tabela 6, é possível afirmar que há 95% de probabilidade da diferença entre dois resultados de uma mesma amostra se situar entre 0,03 e 0,06 g/L. Estas diferenças respeitam os critérios definidos internamente no IVDP para a comparação de métodos para a determinação da Acidez Total (0,14 g/L para toda a gama de trabalho), sendo desta forma uma diferença aceitável.

Finalmente, para garantir que os métodos são estatisticamente semelhantes e uma vez que se trata de gamas alargadas de concentrações, recomenda-se a utilização do método da regressão linear nestes casos. A regressão linear está apresentada a seguir na Tabela 7.

Tabela 7 - Teste de regressão para os resultados de acidez total obtidos para a acidez total pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WineScan FLEX.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,992199345
Quadrado de R	0,984459541
Quadrado de R ajustado	0,983719519
Erro-padrão	0,074871465
Observações	23

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	7,45737519	7,45737519	1330,31145	1,77474E-20
Residual	21	0,117720462	0,005605736		
Total	22	7,575095652			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	0,045594297	0,141077309	0,323186609	0,749750055	-0,247792028	0,338980623	-0,247792028	0,338980623
Variável X 1	0,999586396	0,027405875	36,47343486	1,77474E-20	0,942592759	1,056580033	0,942592759	1,056580033

Com base nas tabelas resultantes do teste de regressão vemos que $R^2 = 0,9844$. Sabemos ainda que há uma regressão linear entre os métodos sendo a equação do tipo $y = Bx + A$, sendo neste caso $B = 0,9996$ e $A = 0,0456$. O desvio associado a A encontra-se de $[-0,248; 0,339]$ logo contém o valor 0 e o desvio associado a B é $[0,943; 1,057]$ contém o 1. Deste modo, podemos admitir que os métodos são estatisticamente semelhantes para toda a gama de trabalho.

Efetuuou-se o mesmo procedimento para comparar o equipamento WineScan FLEX com o equipamento WineScan FT120. Os resultados são apresentados a seguir na Tabela 8 e na Tabela 9.

Tabela 8 - Teste de t de duas amostras emparelhadas para médias para os resultados de acidez total obtidos pelo método FTIR para o equipamento WineScan FT120 e pelo mesmo método no equipamento WineScan FLEX (Anexo 2).

	Valor WineScan FT120	Valor WineScan FLEX
Média	5,138695652	5,116086957
Variância	0,334811858	0,339252174
Observações	23	23
Correlação de Pearson	0,994556528	
Hipótese de <i>diferença</i> de média	0	
gl	22	
Stat t	1,786453556	
P(T<=t) uni-caudal	0,043908044	
t crítico uni-caudal	1,717144374	
P(T<=t) bi-caudal	0,087816088	
t crítico bi-caudal	2,073873068	

Tabela 9 -Teste de regressão aplicado aos resultados de acidez total obtidos pelo método FTIR pelo equipamento WineScan FLEX e pelo equipamento WineScan FT120 (Anexo 2).

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,994556528
Quadrado de R	0,989142687
Quadrado de R ajustado	0,988625672
Erro-padrão	0,061711101
Observações	23

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	7,285887411	7,285887411	1913,180174	4,1012E-22
Residual	21	0,079973459	0,00380826		
Total	22	7,36586087			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	0,083866456	0,11627976	0,721247238	0,478711056	-0,157950543	0,325683455	-0,157950543	0,325683455
Variável X 1	0,988026443	0,022588669	43,73991511	4,1012E-22	0,941050735	1,03500215	0,941050735	1,03500215

Podemos assim comprovar, pelo teste de t, que os resultados obtidos pelos dois equipamentos são estatisticamente semelhantes entre si. Sabemos ainda que $R^2 = 0,98863$. Sendo assim, há uma correlação linear entre os resultados produzidos pelos dois equipamentos e a reta de correlação é $Y = 0,9880x + 0,0839$. O desvio associado a B encontra-se de $[-0,158; 0,326]$ logo contém o valor 0 e o desvio associado a A é $[0,941; 1,035]$ contém o 1.

Concluindo, considera-se que para a calibração de Acidez Total em Vinhos, o método de espectrometria por FTIR no equipamento WineScan FLEX cumpre todas as condições para ser aceite em trabalho de rotina.

2.2 Estudo de robustez

Quando se efetuou a validação da calibração para Acidez Total observou-se que havia algumas amostras em que o equipamento não respondia dentro dos critérios de controlo de qualidade instituídos. Antes de desconsiderar o ajuste fez-se um estudo de robustez das matrizes.

Encontrou-se um total de 12 vinhos que não respondiam corretamente com o ajuste efetuado. Estas amostras foram cuidadosamente analisadas individualmente. Dentro destes havia 10 vinhos tintos e dois brancos. Nos tintos 8 eram DO Douro e 2 eram IG Duriense. Ao analisar cuidadosamente as amostras encontrou-se que 5 continham açúcares redutores superiores a 6,0g/L, entre 7,0 a 9,0g/L. As outras 5 amostras continham um TAV superior a 15% v/v. Estes dois fatores não são comuns em vinhos da região do Douro ^{32,38}. Com base em estudos efetuados pelo laboratório do IVDP e com critérios definidos desde maio de 2018, amostras com estas características são definidas como “matriz estranha” visto que o método não consegue responder corretamente para os vários parâmetros. O mesmo acontece com os dois vinhos brancos analisados, são ambos DO Douro e enquanto um continha 11,9g/L de açúcares redutores, que traduzem valores mais elevados do que o normal, para um vinho branco da região do Douro, o outro vinho tinha um TAV de 11,1% v/v que é inferior ao esperado para um vinho branco desta região. Também estes vinhos brancos seriam classificados como “matriz estranha”.

2.3 Precisão do ajuste

Para implementar um método, é necessário investigar a sua precisão, isto é, avaliar a dispersão de resultado entre ensaios independentes. Utilizaram-se 2 medidas extremas

para avaliar esta dispersão, reprodutibilidade e repetibilidade, e ainda foi calculada a precisão intermédia que é uma medição intermédia.

2.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade é a precisão de um método de ensaio efetuado em condições semelhantes, isto é: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo. Neste caso fizeram-se 10 medições seguidas da mesma matriz. Calculou-se a repetibilidade para 4 tipos de matriz para cobrir toda a gama - vinho branco com alta acidez total, vinho branco, vinho tinto e vinho rosé – visto que geralmente a precisão varia com a gama de concentrações. O valor utilizado como repetibilidade do método é o maior entre todas as matrizes.

Tabela 10 - Resultados da repetibilidade para acidez total em vinho tranquilo no equipamento WineScan FLEX.

	Branco_AT_alta	Branco	Rosé	Tinto
Sr ⁽¹⁾	0,02	0,01	0,01	0,01
Xm ⁽²⁾	6,03	5,51	5,30	4,93
Repetibilidade (r) ⁽³⁾	0,04	0,02	0,04	0,02
Coef. de Var. (%) ⁽⁴⁾	0,26	0,14	0,26	0,17

(1) Desvio padrão (2) Média (3) $r = 2,8 \cdot Sr$ (4) $CV = (Sr/Xm) \cdot 100$

Com base na Tabela 10 podemos afirmar que a repetibilidade do método de determinação da Acidez Total por FTIR no equipamento WineScan FLEX é de 0,04. Isto significa que não deve haver uma diferença maior que 0,04 g/L entre duas leituras da mesma amostra, determinadas em condições de repetibilidade.

2.3.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões utilizando o mesmo método no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente o que se vai alterar: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes épocas. Neste caso realizaram-se 15 leituras da mesma amostra ao longo de um mês. Esta medida de precisão é a mais representativa da variabilidade dos resultados e, como tal, a mais aconselhada.

Tabela 11 - Resultados obtidos para precisão intermédia para acidez total em vinho tranquilo no equipamento WineScan FLEX.

	Branco	Rosé	Tinto
S_{PI} ⁽¹⁾	0,02	0,02	0,02
Xm ⁽²⁾	5,50	5,32	4,81
Precisão intermédia ⁽³⁾	0,06	0,06	0,07
Coef. de Var. ⁽⁴⁾	0,42	0,40	0,50

(1) Desvio padrão (2) Média (3) $PI = 2,8 \cdot S_{PI}$ (4) $CV = (S_{PI}/Xm) \cdot 100$

Tal como acontece com a repetibilidade, toma-se como valor o pior cenário. Assim sendo, a precisão intermédia deste ajuste será de 0,07 g/L (Tabela 11).

2.4 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. O termo exatidão, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos. Para avaliar a exatidão utilizaram-se testes comparativos. Estes testes consistem na comparação dos resultados obtidos por FTIR com os resultados obtidos através do método de referência. Esta comparação é feita diariamente no processo de controlo de qualidade dos resultados.

3. Ajuste de calibração no equipamento WineScan FT120

No decorrer do estágio houve uma alteração legislativa em termos do limite mínimo de título alcoométrico volúmico no vinho do Porto que não está incluído em nenhuma categoria especial, isto é, Tawny, Ruby e Branco que foi fixado em 18%vol ³⁹. Visto que a gama de trabalho do método de quantificação de TAV por FTIR começava em 19,05%, para conseguir dar resposta a esta nova situação foi necessário aumentar a gama de trabalho. O ajuste efetuado é apresentado na figura 8. Para este ajuste utilizaram-se vinhos licorosos incluindo vinho do Porto e vinho Moscatel da região do Douro.

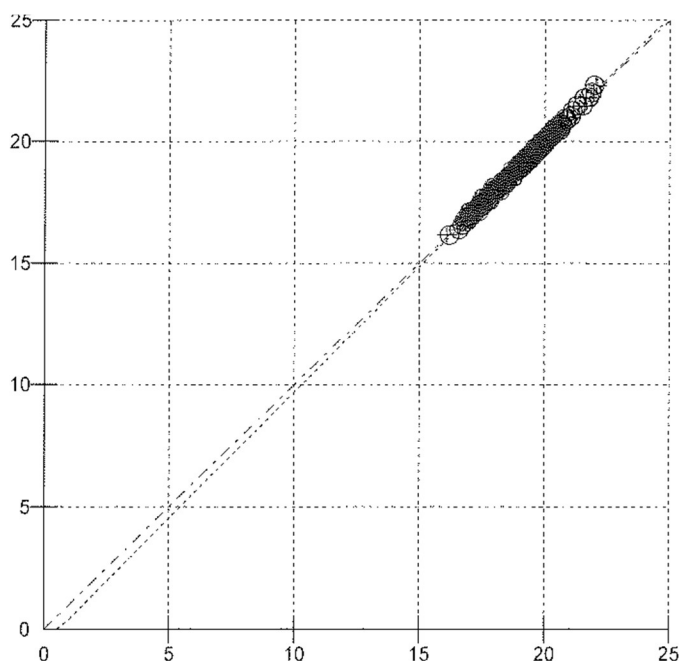


Figura 9 - Gráfico relativo ao ajuste do TAV no equipamento WineScan FT120

Linear Model:	1189 Observations	
	Proposed	Present
Slope:	0.9990	0.9684
Intercept:	0.1174	0.7181
Fit of proposed calibration:		
SEC:	0.0716	
R ² :	0.9944	
Fit of present calibration:		
SE:		0.0781
Mean Bias:		0.0114
Adjustment:	Slope and Intercept	

Figura 10 - Índices da calibração para TAV no equipamento WineScan FT120

Como se confirma pela Figura 10 este conjunto de calibração tem um número elevado de observações, 1189, e como podemos ver pelo gráfico da Figura 9, estas estão bem distribuídas pela gama de trabalho. Nota-se ainda uma alteração bastante significativa tanto no declive como na interceção da reta. O declive afasta-se um pouco do 1 e a interceção afasta-se do 0, no entanto como o SE é menor que o SEC, parte-se do princípio que este afastamento leva a resultados mais exatos. O R² é 0,9944 o que é um valor muito próximo de 1. Estes indicadores mostram que o ajuste da calibração para TAV em Vinho Licoroso no equipamento WineScan FT120 foi realizado com sucesso, no entanto, é necessário proceder à sua validação. Esta validação vai ser efetuada ao comparar estatisticamente os resultados obtidos por FTIR no equipamento WineScan FT120 e os resultados obtidos pelo método oficial para a determinação do TAV²³.

3.1 Validação do ajuste

Tal como na situação descrita acima, foi necessário validar o ajuste antes de o poder utilizar. Para isso utilizaram-se 4 vinhos brancos, um vinho branco 40 anos, 9 vinhos tintos, 2 vinhos tintos 10 anos, 4 vinhos tintos colheita (1953, 1968, 1969 e 2007), 2 LBV, 2 vinhos tintos 40 anos, 2 Ruby's, 2 Tawny's e 3 Vintage 2017. As amostras utilizadas tinham um valor de TAV entre 16,35 e 21,98%.

Aplicou-se o teste de t com 95% de confiança para avaliar se o método de quantificação do TAV por FTIR é estatisticamente semelhante ao método oficial.

² OIV-MA-AS312-01A

³ OIV-MA-AS312-01B

Tabela 12 - Teste de t aplicado a duas variáveis emparelhadas para médias aplicado aos resultados de TAV obtidos pelo método oficial e o método FTIR no equipamento WineScan FT120. (Anexo 3)

	Valor M.O.	Valor WineScanFT120
Média	19,18828571	19,17628571
Variância	1,834032269	1,788429916
Observações	35	35
Correlação de Pearson	0,999304933	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	34	
Stat t	1,340514776	
P(T<=t) uni-caudal	0,09448349	
t crítico uni-caudal	1,690924255	
P(T<=t) bi-caudal	0,18896698	
t crítico bi-caudal	2,032244509	

Tendo em conta a Tabela 12, afirma-se que o teste confirma a hipótese nula, ou seja, os métodos são estatisticamente semelhantes visto que o t experiencial é inferior ao t tabelado.

Tabela 13 - Teste de regressão aplicado aos resultados obtidos pela nova calibração para TAV no equipamento WineScan FT120 e pelo método oficial. (Anexo 3)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999304933
Quadrado de R	0,998610348
Quadrado de R ajustado	0,998568238
Erro-padrão	0,051243518
Observações	35

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	62,2704425	62,2704425	23713,95953	9,94549E-49
Residual	33	0,086654639	0,002625898		
Total	34	62,35709714			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interceptar	-0,217447042	0,126314004	-1,721480088	0,094527242	-0,474434815	0,039540731	-0,474434815	0,039540731
Variável X 1	1,011965145	0,006571485	153,993375	9,94549E-49	0,998595359	1,025334932	0,998595359	1,025334932

Pelo teste de regressão (Tabela 13) sabemos que $R^2 = 0,9986$. Sabemos ainda que há uma regressão linear entre os métodos sendo a equação do tipo $y = Bx + A$, sendo neste caso $B = 1,01197$ e $A = -0,21744$. O desvio associado a A encontra-se de $[-0,4744; 0,0395]$ logo contém o valor 0 e o desvio associado a B é $[0,9985; 1,02533]$ contém o 1.

Tendo em conta os resultados apresentados anteriormente, podemos admitir que há uma correlação linear entre os métodos e que estes são estatisticamente semelhantes para toda a gama de trabalho.

3.2 Estudo de robustez

Visto que foi feito um aumento da gama de trabalho para a calibração do TAV, foi necessário fazer um estudo para confirmar que amostras com concentrações baixas de álcool não interferem com a leitura de outras calibrações em uso. Assim, foram efetuados testes de t para todas as calibrações acreditadas para comprovar que o método oficial e o método de espectrometria por FTIR é estatisticamente semelhante nas leituras da Acidez Total, Acidez Volátil, pH, G+F e Massa Volúmica. Todos os testes confirmaram a hipótese nula, logo os métodos são semelhantes para todas as calibrações.

3.3 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão de um processo analítico. A precisão pode ser considerada ao nível de repetibilidade e da precisão intermediária^{40,41}. A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) num pequeno espaço de tempo. Repetibilidade, pode ser avaliada com um mínimo de nove determinações. A precisão intermédia expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos. Ambas a repetibilidade e a precisão intermédia foram calculadas anteriormente para este método e, partiu-se do princípio que para a nova calibração seriam os mesmos valores. Neste caso, a repetibilidade é de 0,06 (% v/v) e a precisão intermédia de 0,08 (%v/v).

3.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão da calibração utilizaram-se os ensaios interlaboratoriais. Enviou-se a mesma amostra a analisar para vários laboratórios. Com o objetivo de avaliar se os resultados produzidos pela calibração nova se distanciam muito dos produzidos pelos outros laboratórios. Para uma fácil avaliação do desempenho é calculado um valor conhecido como “z score”. Este valor calcula-se utilizando a seguinte fórmula:

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{S}$$

Em que X_{lab} é o valor obtido pelo laboratório em questão, X_v é o valor tomado como verdadeiro, ou seja, o estabelecido no ensaio e S é o desvio associado ao ensaio neste caso é o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial. Assim foram calculados 5 z scores para 4 EIL's do circuito ALABE e 1 do circuito BIPEA. Todos os “z score” são inferiores a dois, podemos afirmar que o ensaio é aceitável e por isso aceitamos que o método apresentar resultados exatos.

4. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) é um procedimento estatístico que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente correlacionadas, denominadas componentes principais. O número de componentes principais é menor ou igual ao número de variáveis originais.

O PCA reduz a dimensão do conjunto de dados original ao aglutinar as amostras tendo em conta um novo conjunto de variáveis conhecidas como componentes principais. Normalmente, apenas os dois primeiros PCs são necessários para explicar a maior parte da variação no conjunto de dados original ⁴². Neste caso foram utilizados 3 PC's para gerar uma saída gráfica designado, gráfico de pontuação (representado na figura 11). As amostras com pontuações semelhantes ocuparão posições semelhantes, enquanto aqueles com pontuações diferentes serão posicionados a alguma distância, permitindo assim que as amostras sejam agrupadas, formando os *clusters*.

Neste estudo, o equipamento WineScan FT120 foi utilizado para gerar o espectro FTIR de um grande número de vinhos do Porto, e o PCA foi utilizado como ferramenta para identificar as principais fontes de variação entre os vinhos. Um espectro FTIR de um vinho fornece a absorvância coletiva de todos os componentes ativos de IR presentes na amostra. Para a calibração do PCA foi necessário fornecer amostras que foram identificadas como vinho do Porto. Este grupo de amostras era constituído por todo o tipo de Vinhos do Porto, para que fosse possível enquadrar qualquer amostra vinho licoroso no grupo correto. Para isso utilizaram-se 316 amostras: vinhos brancos entre os quais foram incluídas categorias especiais (10 Anos, 20 Anos, 30 Anos, Colheitas e Reserva) e vinhos tintos das categorias especiais 10 Anos, 20 Anos, 30 Anos, e Mais que 40 anos, Crusted, Colheita, Vintage, LBV, além de vinhos das categorias Tawny e Ruby. Na Figura 11 está ilustrado graficamente a calibração para o ajuste do PCA. Após vários testes, foi possível concluir que um PCA a 3 fatores com limiar de 3,00 é o que apresenta melhores resultados.

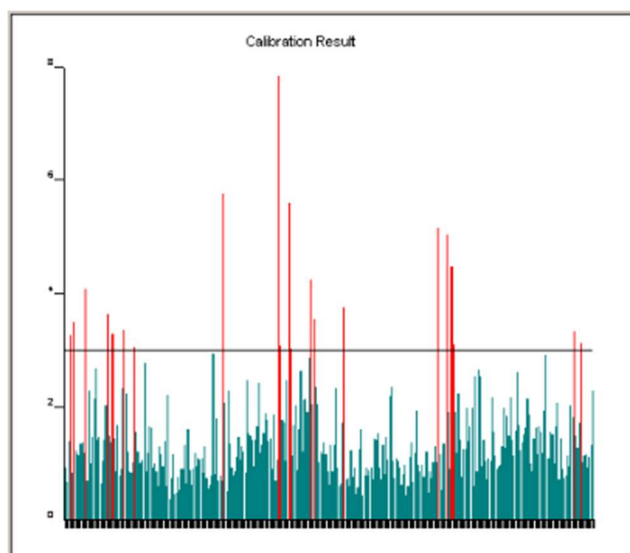


Figura 11 - Calibração do PCA para vinho do Porto. Assinalados a vermelho são os vinhos que estão acima do limiar definido e a verde os que estão abaixo do limiar definido.

Para a validação deste modelo utilizaram-se vinhos da Madeira, outros vinhos licorosos e vinhos aprovados como Vinho do Porto, tanto pelo Laboratório como pela Câmara de Provedores do IVDP. Este modelo dividiu os vinhos corretamente entre os grupos com uma percentagem de 97,3%. Na Figura 12 está apresentado graficamente a divisão entre os grupos sendo que apenas um Vinho do Porto foi mal classificado. Este vinho apresentava uma concentração de açúcar atipicamente elevada e, provavelmente, provém daí a diferença espectral significativa para o distinguir dos outros vinhos.

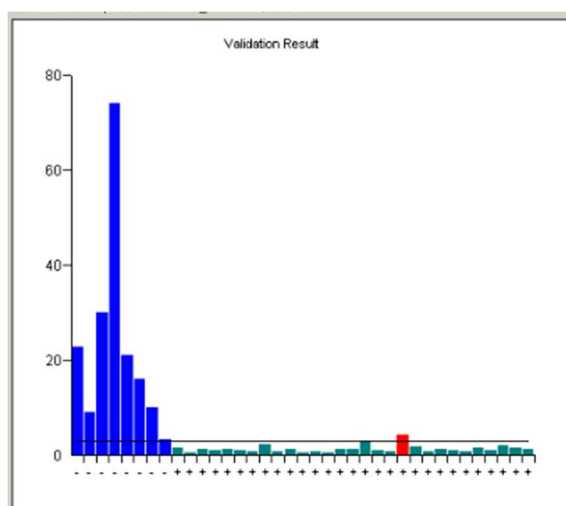


Figura 12 - Validação do PCA para vinho do Porto. As amostras assinaladas a azul são “não vinho do Porto” enquadrados segundo o modelo no grupo de “não vinho do Porto”, as amostras assinaladas a verde são “vinho do Porto” enquadrado segundo o modelo como “vinho do Porto” e as assinaladas a vermelho são vinhos incluídos no grupo errado.

Este modelo tornou-se uma ferramenta com utilidade para a avaliação de vinhos potencialmente estranhos. Esta ferramenta foi também utilizada para estudar a robustez de alguns ajustes visto que, mesmo que não seja possível perceber o motivo, sabemos que os vinhos com o valor de PCA maior que 3 são diferentes do grupo que o utilizador definiu como “vinho do Porto” e, portanto, podem não responder corretamente ao método.

Conclusão

O objetivo deste trabalho centrou-se essencialmente na integração da estagiária nas atividades diárias do laboratório do IVDP, bem como o enquadramento com a documentação utilizada no laboratório, sobretudo a nível de controlo de qualidade dos resultados. Foi importante a familiarização da estagiária com a norma NP 17025, visto que durante a duração do estágio o laboratório estava em adaptação à nova versão da norma. Houve um grande foco nas competências desenvolvidas no manuseio dos dois equipamentos de FTIR (WineScan FT120 e WineScan Flex), materiais ou reagentes e tratamento de resultados ligados aos mesmos.

Numa segunda fase do estágio foram efetuados, com sucesso, diversos ajustes nas calibrações de múltiplos parâmetros analíticos: TAV, pH, Massa Volúmica, Acidez Volátil e Acidez Total em vinhos e TAV, pH, Massa Volúmica, Acidez Volátil, Acidez Total e Glucose + Frutose em vinhos licorosos para o equipamento WineScan FLEX. Neste relatório, foi apresentado o exemplo da Acidez Total em Vinhos.

Foi ainda efetuado um ajuste da calibração para TAV em vinhos licorosos no equipamento WineScan FT120, o qual foi apresentado neste relatório.

Todos os ajustes efetuados, foram devidamente validados recorrendo a diversos testes estatísticos.

Numa terceira fase houve ainda oportunidade de explorar alguns modelos de tratamento espectral no *software* do equipamento WineScan FT120 tendo daí resultado um modelo de PCA apresentado no trabalho.

Durante o estágio para além de haver uma preocupação com a integração da estagiária na rotina e no modo de funcionamento do laboratório, fui encorajada na procura de melhorias do método. O estágio foi concluído cumprindo todos os objetivos propostos.

Bibliografia

1. Mar M da agricultura e do. Decreto-Lei n.º 97/2012, de 23 de abril. 2012:2331-2332.
2. IVDP. <https://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=8&codSeccao=1&idioma=0>.
3. Moreira N, Guedes de Pinho P. *Port Wine*. Vol 63. 1st ed. Elsevier Inc.; 2011.
4. Carlos F. Decreto-Lei nº 173/2009. 2009:4996-5006.
5. Magalhães N. Manual de Boas Práticas na Região Demarcada do Douro. 2012:82.
6. IPAC. Anexo Técnico de Acreditação Nº L0115-1. 2018:2-5.
7. IPQ. <http://www1.ipq.pt/PT/Normalizacao/NormasPortuguesasReexame/Documents/Formação sobre Normas e Normalização 2017 Professores.pdf>.
8. IPAC. Guia para aplicação da NP EN ISO/IEC 17020. 2013:12.
9. ISO. *NP EN ISO/IEC 17025:2005*.
10. RELACRE. *Guia Relacre-Elaboração Do Manual Da Qualidade de Laboratórios*; 2006.
11. LABORATÓRIOS U-VPPA. Manual da qualidade. *Manuais Holon*. 2014:1-15.
12. Fuller RC. Religion and ritual in American wine culture. *J Am Cult*. 1993;16:39-45. doi:WM No. 3824
13. European Union. COUNCIL REGULATION (EC) No 1493/1999. *Off J Eur Communities*. 2004;L 269(September 2000):1-15.
14. IVDP. A REGIÃO DEMARCADA DO DOURO. 2001:1-3.
15. Pascal Ribéreau-Gayon, Denis Dubourdieu, B. Doneche AL. *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications, Volume 1*. Vol 1.; 2006.
16. Carrera C. *Vinho Do Porto e a Região Do Douro: História Da Primeira Região Demarcada*; 2002.
17. Fox R. regulamento242/2010. 2010;5(1976):265-288.
18. Isabel M, Lourenço C, Afonso L, Leitão P. Regulamento nº 242/2010. 2010:11988-11997.
19. Silva ABCFR da. *Porto Do Vinho*. (Editora LC, ed.); 2007.
20. Richard Mayson. *The Wines and Vineyards of Portugal*; 2003.

21. Jaggi N, Electrical E. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*.; 2006.
22. Perkins WD. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. Part I Instrumentation. *J Chem Educ*. 1986;63(1):5-10.
23. Nicolet T, All C. Thermogravimetric Analysis. 2001;199(1):1-8.
24. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman GSK. Introduction to Spectroscopy. 2000.
25. Hsieh HN. FTIR Instrumentation. *Public Domain*. 2008:6. <http://www-ec.njit.edu/~hsieh/ene669/FTIR.html>.
26. Ma G, Allen HC. *Handbook of Spectroscopy*. Vol 126.; 2004.
27. <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>.
28. Silverstein, Robert; Webster, Francis; Kiemle D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 3rd Edition*.; 2002.
29. Bauer R, Nieuwoudt H, Bauer FF, Kossmann J, Koch KR, Esbensen KH. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Anal Chem*. 2008;80(5):1371-1379.
30. Moreira JL, Santos L. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Anal Chim Acta*. 2004;513(1):263-268. doi:10.1016/j.aca.2003.09.029
31. Patz CD, Blieke A, Ristow R, Dietrich H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal Chim Acta*. 2004;513(1):81-89. doi:10.1016/j.aca.2004.02.051
32. IVDP I. Açúcares Totais Vinho DOP Douro – 2008 / 2015. 2015:1-7.
33. IVDP. MIVDP 65 - Método 3ª Edição.
34. IVDP. MIVDP 65 Controlo da Qualidade - 10ª Edição.
35. Wold, S; Ruhe, A; Wolds, H; Dunn W. THE COLLINEARITY PROBLEM IN LINEAR REGRESSION. THE PARTIAL LEAST SQUARES (PLS) APPROACH TO GENERALIZED INVERSES. 1984;5(3):735-743.
36. Otto M. Selectivity in multicomponent analysis. 1986;180:445-456.
37. IVDP. Procedimento de tratamento de resultados diários do MIVDP 65 - 10ª Edição.
38. IVDP I. Nota técnica Título Volúmico Adquirido (TAV). 2017:1-6.
39. *Decreto-Lei n.º 7/2019 - Diário Da República n.º 10/2019, Série I de 2019-01-15*.; 2019:183-184.
40. Hubert P, Chiap P, Crommen J, et al. The SFSTP guide on the validation of

- chromatographic methods for drug bioanalysis: From the Washington Conference to the laboratory. *Anal Chim Acta*. 1999;391(2):135-148.
41. ISO. Iso 5725-5. 1998;1998.
42. Kamil M, Asri M, Desa W, Ismail D. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Principal Component Analysis (PCA) of Unbranded Black Ballpoint Pen Inks. *Malaysian J Forensic Sci*. 2015;6(1):48-53.

Anexos

Anexo 1 - resultados de acidez total obtidos pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WineScan Flex para as mesmas amostras.

Amostra	Tipo de vinho	Resultado MO	Resultado WineScan Flex	Diferença absoluta
1	Branco/2017	6,16	6,29	-0,13
2	Tinto/2016	4,79	4,87	-0,08
3	Tinto/2017	5,32	5,39	-0,07
4	Rosado/2017	4,74	4,78	-0,04
5	Tinto/2016	4,78	4,78	0,00
6	Tinto/2014	5,45	5,45	0,00
7	Tinto/2017	4,28	4,27	0,01
8	Tinto/2016	4,64	4,61	0,03
9	Branco/2017	4,38	4,35	0,03
10	Tinto/2016	4,96	4,92	0,04
11	Branco/2017	5,22	5,18	0,04
12	Branco/2017	4,91	4,86	0,05
13	Tinto/2017	5,02	4,97	0,05
14	Tinto/2017	4,38	4,31	0,07
15	Branco/2017	5,27	5,19	0,08
16	Tinto/2017	5,67	5,59	0,08
17	Branco/2016	6,36	6,27	0,09
18	Tinto/2016	5,24	5,14	0,10
19	Tinto/2017	4,79	4,68	0,11
20	Tinto/2014	5,54	5,42	0,12
21	Branco/2017	6,32	6,19	0,13
22	Tinto/2008	5,59	5,45	0,14
23	Tinto/2016	4,86	4,71	0,15
Média		5,1596	5,1161	0,0435

Anexo 2 - Resultados de acidez total pelo método FTIR no equipamento WINESCAN FT120 e WINESCAN FLEX

Amostra	Tipo de vinho	Valor WINESCAN FT120	Valor WINESCAN FLEX
1	Branco/2017	6,20	6,29
2	Tinto/2016	4,85	4,87
3	Tinto/2017	5,35	5,39
4	Rosado/2017	4,75	4,78
5	Tinto/2016	4,74	4,78
6	Tinto/2014	5,44	5,45
7	Tinto/2017	4,31	4,27
8	Tinto/2016	4,65	4,61
9	Branco/2017	4,32	4,35
10	Tinto/2016	4,91	4,92
11	Branco/2017	5,26	5,18
12	Branco/2017	4,88	4,86
13	Tinto/2017	4,98	4,97
14	Tinto/2017	4,35	4,31
15	Branco/2017	5,22	5,19
16	Tinto/2017	5,61	5,59
17	Branco/2016	6,27	6,27
18	Tinto/2016	5,12	5,14
19	Tinto/2017	4,80	4,68
20	Tinto/2014	5,46	5,42
21	Branco/2017	6,27	6,19
22	Tinto/2008	5,62	5,45
23	Tinto/2016	4,83	4,71

Anexo 3 - Resultados de TAV pelo método oficial e pelo método FTIR no equipamento WINESCAN FT120

Amostra	Tipo de vinho	Valor WINESCAN FT120	Valor MO
1	Rosado/2017	12,26	12,32
2	Tinto/2016	12,94	12,93
3	Tinto/2015	13,50	13,42
4	Tinto/2017	12,89	12,86
5	Tinto/2017	13,39	13,31
6	Branco/2017	13,48	13,33
7	Tinto/2016	12,93	12,92
8	Branco/2017	13,91	13,82
9	Tinto/2008	13,86	13,86
10	Tinto/2016	12,93	12,92
11	Tinto/2016	12,63	12,64
12	Rosado/2017	12,42	12,36
13	Branco/2017	13,88	13,74
14	Tinto/2017	12,47	12,42
15	Tinto/2014	14,31	14,29
16	Tinto/2016	13,31	13,28
17	Branco/2017	12,85	12,83
18	Branco/2015	12,68	12,61
19	Branco/2017	14,51	14,49
20	Tinto/2015	12,97	12,96
21	Tinto/2014	13,36	13,36
22	Tinto/2015	12,63	12,64
23	Tinto/2015	13,61	13,58
24	Tinto/2016	12,84	12,82
25	Branco/2017	14,33	14,36
26	Tinto/2016	12,80	12,78
27	Tinto/2011	14,68	14,72
28	Tinto/2017	13,48	13,45
29	Tinto/2016	12,96	12,96
30	Tinto/2017	13,45	13,44
31	Tinto/2016	13,30	13,32
32	Tinto/2017	13,09	13,07
33	Tinto/2017	14,45	14,28
34	Branco/2016	13,27	13,24